

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042663**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.09

(21) Номер заявки
201992485

(22) Дата подачи заявки
2018.04.19

(51) Int. Cl. *A61K 9/127* (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(54) Р-ЭТОКСИ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ STAT3

(31) **62/487,292**

(32) **2017.04.19**

(33) **US**

(43) **2020.02.17**

(86) **PCT/US2018/028259**

(87) **WO 2018/195249 2018.10.25**

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

(72) Изобретатель:
Асидзава Ана Тари (US)

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

(56) **US-A1-20070202157**
US-A1-20050074879
US-A1-20030180789
US-A1-20070031844
US-A1-20050260646
US-A1-20140336237
US-A1-20080249046
WO-A1-2017066643
US-A-5602240

GARBUZENKO et al. "Intratracheal Versus Intravenous Liposomal Delivery of siRNA: Antisense Oligonucleotides and Anticancer Drug", Pharmaceutical Research, 1 February 2009 (01.02.2009), Vol. 26, No. 2, Pgs. 382-394, entire document

WO-A2-2005100606
GUTIERREZ-PUENTE et al. "Safety, Pharmacokinetics, and Tissue Distribution of Liposomal P-Ethoxy Antisense Oligonucleotides Targeted to Bcl-2", Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1 November 1999 (01.11.1999), Vol. 291, No. 2, Pgs. 865-869, entire document

(57) В изобретении предложены улучшенные системы доставки олигонуклеотидов, причем указанная система доставки содержит липосому, которая содержит нейтральные фосфолипиды и Р-этоксид олигонуклеотид, который нацелен на полинуклеотид, кодирующий STAT3. Также предложены способы лечения пациентов с помощью указанных систем доставки.

B1**042663****042663 B1**

Заявка на данное изобретение заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/487292, поданной 19 апреля 2017 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники **Область изобретения**

Данное изобретение в целом, как правило, относится к области медицины. Более конкретно, оно касается липосомных готовых форм Р-этоксидных олигонуклеотидов, которые гибридизируются с полинуклеотидным продуктом гена STAT3, и способов получения и применения таких готовых форм в медицине, особенно в лечении солидных и гематологических видов рака, которые имеют высокую экспрессию или повышенную активность гена STAT3.

Описание предшествующего уровня техники

Многие гены вовлечены в устойчивую пролиферацию и выживание раковых клеток в предзлокачественных опухолях и рефрактерных опухолях поздних стадий развития. Члены сигнальных путей переносчиков сигналов и активаторов транскрипции (STAT), как известно, играют важную роль в этом свойстве. STAT3 является транскрипционным фактором, который активируется в около 70% всех солидных опухолей и видов рака крови. При активации STAT3 транслоцируется из цитозоля в ядро, чтобы управлять экспрессией большого количества генов, включая Survivin, Bcl-X_L, Mcl-1, c-Myc, циклин D1, p21, циклин E, матриксную металлопротеиназу-9 и -2 и VEGF, для регуляции широкого спектра клеточных процессов, таких как выживание клеток, рост, миграция, инвазия, метастазирование и ангиогенез (Wu et al., 2011; Hardee et al., 2013). Кроме того, STAT3 регулирует несколько важных сигнальных путей, участвующих в прогрессировании рака, включая каскады ИЛ-3, ИЛ-6 и NF-κB, а также активирует пути обратной связи, усиливая свою собственную активацию (Hardee et al., 2013).

В то время как STAT3 обычно экспрессируется на низких уровнях в цитозоле здоровых клеток, он часто избыточно экспрессируется и активируется (фосфорилируется и локализуется в ядре) при раке, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (ДКВКЛ). При ДКВКЛ он чаще всего активируется в ABC-подтипе заболевания и реже в GC-подтипе ДКВКЛ (Wu et al., 2011; Hardee et al., 2013; Scuto et al., 2011). Важно, что избыточная экспрессия STAT3, гиперфосфорилирование и ядерная локализация коррелируют с худшим общим прогнозом в таких опухолях по сравнению с опухолями, экспрессирующими более низкие уровни STAT3. Кроме того, опухоли, несущие чрезмерно активированный STAT3, также демонстрируют увеличенный сигнальный NF-κB при ABC-подтипе ДКВКЛ, что указывает на то, что сигнальный STAT3 играет роль в прогрессировании ДКВКЛ.

Из-за природы белка STAT3 разработка малых молекул для прямого нацеливания на его сигнальную активность затруднена, что делает его идеальной мишенью для антисмыслового и других генетических подходов нокдауна. Учитывая центральную роль, которую STAT3 играет во многих формах рака и других заболеваниях, было предпринято несколько попыток разработать пептид, олигонуклеотидную ловушку и соединения на основе малых молекул, чтобы блокировать активацию STAT3, димеризацию, связывание ДНК или чтобы ускорить инактивацию фермента (Miklossy et al., 2013). В качестве альтернативного подхода несколько групп работают над разработкой ингибиторов киназы Janus (JAK) для блокирования фосфорилирования и активации STAT3 при ЛЛС (лимфоцитарная лимфосаркома) и других заболеваниях с различным успехом (Amin et al., 2003; Fagard et al., 2013).

Подходы, которые нацелены на STAT3, конкретно включают в себя применение олигонуклеотидов для блокирования трансляции мРНК STAT3 в белок или для индукции деградации РНК с помощью механизмов РНКазы Н посредством технологии на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АСО). Эти стратегии предлагают способ снижения токсичности и менее адаптированы к мутациям устойчивости. Несколько попыток такого подхода для STAT3 не увенчались успехом. Таким образом, существует потребность в улучшенных антисмысловых композициях, нацеленных на STAT3, для применения в лечении заболеваний.

Сущность изобретения

В данном документе предложены композиции и способы, которые индуцируют ингибирование роста и/или апоптоз в широком наборе раковых клеток, контролируемых STAT3. Экспрессия белка STAT3 предотвращается нетоксичным устойчивым к нуклеазам олигонуклеотидом, который нацелен на полинуклеотиды, кодируемые STAT3, в комбинации с нейтральной липосомой, тем самым устраняя пул доступного белка STAT3.

В одном варианте осуществления предложены композиции, содержащие популяции олигонуклеотидов, которые гибридизируются с полинуклеотидным продуктом гена STAT3. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции состоят из нуклеозидных молекул, соединенных друг с другом фосфатными связями остова, причем по меньшей мере одна из фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой Р-этоксидную связь остова, и при этом не больше чем 80% фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидные связи остова. В некоторых аспектах по меньшей мере одна из фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляет собой фосфодиэфирную связь остова. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1-4. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последователь-

ность согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 4. В различных аспектах, олигонуклеотиды популяции ингибируют экспрессию STAT3. В некоторых аспектах композиция является лиофилизированной.

В некоторых аспектах от 10 до 80% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова; от 20 до 80% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова; от 30 до 80% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова; от 40 до 80% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова; от 50 до 80% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова или от 60 до 70% фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова и любой диапазон, полученный из них. 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 представляют собой фосфодиэфирные связи остова и любой диапазон, полученный из них.

В различных аспектах по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, или какое-либо значение между ними, фосфатных связей остова представляют собой Р-этоксидные связи остова. В различных аспектах по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, или какое-либо значение между ними, фосфатных связей остова представляют собой фосфодиэфирные связи остова. В определенных аспектах фосфодиэфирные связи остова распределены по всем олигонуклеотидам. Как таковые, олигонуклеотиды не являются химерными молекулами. В некоторых аспектах олигонуклеотиды не содержат фосфотиоатной связи остова.

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 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 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 больше чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 соответственно фосфатные связи остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова. В некоторых аспектах олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 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, 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. Например, олигонуклеотиды в популяции могут иметь средний размер 18 нуклеотидов, причем не больше чем 14 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова; олигонуклеотиды в популяции могут иметь средний размер 20 нуклеотидов, причем не больше чем 16 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова; олигонуклеотиды в популяции могут иметь средний размер 25 нуклеотидов, причем не больше чем 20 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова; или олигонуклеотиды в популяции могут иметь средний размер 30 нуклеотидов, причем не больше чем 24 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова.

В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов содержит один вид олигонуклеотидов. В других аспектах популяция олигонуклеотидов содержит по меньшей мере два вида олигонуклеотидов. Один вид олигонуклеотида может иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, но иметь или не иметь Р-этоксидные связи в разных позициях в молекуле. Таким образом, популяция может быть гомогенной по нуклеотидной последовательности и гетерогенной по распределению фосфодиэфирных связей остова среди олигонуклеотидов популяции. Кроме того, популяция может быть гетерогенной по количеству Р-этоксидных связей остова и фосфодиэфирных связей остова среди олигонуклеотидов популяции. В качестве неограничивающего примера первая часть олигонуклеотидов в популяции может иметь 70% Р-этоксидных связей и 30% фосфодиэфирных связей, тогда как вторая часть олигонуклеотидов в популяции может иметь 60% Р-этоксидных связей и 40% фосфодиэфирных связей. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов содержит антисмысловые олигонуклеотиды, короткие интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК (микроРНК) или piwiRNAs (piРНК).

В различных аспектах композиция дополнительно содержит фосфолипиды. В некоторых аспектах фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют в молярном соотношении от около 5:1 до около 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 меньше чем 5 мкм. 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 меньше чем 4 мкм. В некоторых аспектах популяция олигонуклеотидов включена в популяцию липосом.

В некоторых аспектах фосфолипиды являются незаряженными или имеют нейтральный заряд при физиологическом pH. 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 по существу не содержат холестерина.

В одном варианте осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие композицию олигонуклеотидов и фосфолипидов согласно данным вариантам осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит химиотерапевтический агент.

В одном варианте осуществления предложены способы доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку, включающие в себя приведение в контакт клетки с фармацевтической композицией согласно данным вариантам осуществления. В некоторых аспектах способ представляет собой способ лечения гиперплазии, рака, аутоиммунного заболевания или инфекционного заболевания.

В одном варианте осуществления предложены способы лечения субъекта с раком, аутоиммунным заболеванием или инфекционным заболеванием, включающие в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно данным вариантам осуществления. В некоторых аспектах субъект является человеком. В некоторых аспектах рак представляет собой рак мочевого пузыря, крови, лимфому, рак поджелудочной железы, костей, костного мозга, мозга, груди, толстой кишки, пищевода, желудка, головы и шеи, почки, печени, легкого, простаты, кожи, яичка, языка, яичника или матки. В различных аспектах рак представляет собой аденокарциному легкого, лейкоз, лимфому, такую как, например, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, или аденокарциному протоков поджелудочной железы. В некоторых аспектах аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку, спондилоартропатию, болезнь 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 внутривенно. В некоторых аспектах способ дополнительно включает в себя введение субъекту по меньшей мере второй противораковой терапии. В некоторых аспектах вторая противораковая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормонотерапию, иммунотерапию или терапию цитокинами. В некоторых аспектах иммунотерапия представляет собой терапию блокады контрольных точек. В некоторых аспектах введение композиции уменьшает экспрессию белка STAT3 у пациента.

Олигонуклеотид включает в себя молекулу антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая специфически гибридизируется с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-мишень, или регулирующей экспрессию белка-мишени. "Специфическая гибридизация" означает, что молекула антисмысловой нуклеиновой кислоты гибридизируется с молекулой-мишенью нуклеиновой кислоты и регулирует ее экспрессию. Предпочтительно, "специфическая гибридизация" также означает, что не затрагиваются любые другие гены или транскрипты. 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 больше количество нуклеиновых оснований. В конкретных аспектах, олигонуклеотид может содержать от 15 до 30, от 19 до 25, от 20 до 23 или 21 смежных нуклеиновых оснований. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид ингибирует трансляцию гена, который стимулирует рост раковой или предраковой или гиперпластической клетки млекопитающего (например, клетки человека). Олигонуклеотид может вызывать апоптоз в клетке и/или ингибировать трансляцию онкогена или другого гена-мишени. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотидный компонент содержит один вид олигонуклеотида. В других вариантах осуществления олигонуклеотидный компонент содержит 2, 3, 4 или большее количество видов олигонуклеотидов, которые нацелены на 1, 2, 3, 4 или большее количество генов. Композиция может дополнительно содержать химиотерапевтический или другой противораковый агент, который может быть включен или не включен в липидный компонент или липосому согласно изобретению. В дополнительных вариантах осуществления олигонуклеотидный компонент включен в липосому или липидный компонент.

"Захватывать", "инкапсулировать" и "включать" относятся к липиду или липосоме, формирующим препятствие для свободной диффузии в раствор в результате ассоциации с или вокруг агента интереса, например, липосома может инкапсулировать агент в липидном слое или внутри водосодержащего компартмента внутри или между липидными слоями. В некоторых вариантах осуществления композиция содержится в фармацевтически приемлемом носителе. Фармацевтически приемлемый носитель может быть приготовлен для введения человеку или пациенту.

В некоторых вариантах осуществления липидный компонент имеет по существу нейтральный заряд, поскольку он содержит нейтральный фосфолипид, или совокупный нейтральный заряд. В некоторых аспектах нейтральный фосфолипид может представлять собой фосфатидилхолин, такой как DOPC, яичный фосфатидилхолин ("EPC"), дилауроилфосфатидилхолин ("DLPC"), димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), диолеоилфосфатидилхолин, 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диейкосеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), 1-миристоил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("MPPC"), 1-пальмитоил-2-миристоил фосфатидилхолин ("PMPC"), 1-пальмитоил-2-стеароил фосфатидилхолин ("PSPC"), 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("SPPC"), 1-пальмитоил-2-олеоил фосфатидилхолин ("POPC"), 1-олеоил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("OPPC") или лизофосфатидилхолин. В других аспектах нейтральный фосфолипид может представлять собой фосфатидилэтаноламин, такой как диолеоилфосфатидилэтаноламин ("DOPE"), дистеароилфосфатидилэтаноламин ("DSPE"), димиристоил фосфатидилэтаноламин ("DMPE"), дипальмитоил фосфатидилэтаноламин ("DPPE"), пальмитоилолеоил фосфатидилэтаноламин ("POPE") или лизофосфатидилэтаноламин.

В определенных вариантах осуществления фосфолипидный компонент может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или большее количество видов или типов нейтральных фосфолипидов. В других вариантах осуществления фосфолипидный компонент может содержать 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество видов или типов нейтральных фосфолипидов.

В некоторых вариантах осуществления липидный компонент может иметь по существу нейтральный заряд, поскольку он содержит положительно заряженный липид и отрицательно заряженный липид. Липидный компонент может дополнительно содержать нейтрально заряженный липид(ы) или фосфолипид(ы). Положительно заряженный липид может быть положительно заряженным фосфолипидом. Отрицательно заряженный липид может быть отрицательно заряженным фосфолипидом. Отрицательно заряженный фосфолипид может представлять собой фосфатидилсерин, такой как димиристоил фосфатидилсерин ("DMPS"), дипальмитоил фосфатидилсерин ("DPPS") или фосфатидилсерин мозга ("BPS"). Отрицательно заряженный фосфолипид может представлять собой фосфатидилглицерин, такой как дилауроилфосфатидилглицерин ("DLPG"), димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерин ("DSPG"), или диолеилфосфатидилглицерин ("DOPG"). В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит холестерин или полиэтиленгликоль (PEG). В других вариантах осуществления композиция по существу не содержит холестерина. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид представляет собой природный фосфолипид. В других вариантах осуществления фосфолипид представляет собой синтетический фосфолипид.

Липосомы могут быть приготовлены из одного или большего количества фосфолипидов при условии, что липидный материал по существу является незаряженным. Важно, чтобы композиция по существу не содержала анионных и катионных фосфолипидов и холестерина. Подходящие фосфолипиды включают в себя фосфатидилхолины и другие, которые хорошо известны специалистам в данной области техники.

Другой аспект данного изобретения включает в себя способы доставки олигонуклеотида в клетку, включающие в себя приведение в контакт клетки с нейтральной липидной композицией согласно изобретению. Способы предоставляют композицию по изобретению в эффективном количестве. Эффективное количество представляет собой количество терапевтического компонента, которое ослабляет, замедляет, уменьшает или устраняет клетку, патологию или болезненное состояние у субъекта. Клетка может содержаться в субъекте или пациенте, таком как человек. Способ может дополнительно включать в себя способ лечения рака или другой гиперпластической патологии. Рак возможно берет начало из мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десны, головы, почки, печени, лимфатического узла, легкого, носоглотки, шеи, простаты, кожи, желудка, яичка, языка, яичника или матки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя способ лечения незлокачественного заболевания или гиперпластической патологии. Клетка может быть предраковой или раковой. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы ингибируют рост клетки, индуцируют апоптоз в клетке и/или ингибируют трансляцию онкогена. Олигонуклеотид может ингибировать трансляцию гена, который сверхэкспрессируется в раковой клетке.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают в себя введение дополнительной терапии субъекту. Дополнительная терапия может включать в себя введение химиотерапевтического агента (например, паклитаксела или доцетаксела), хирургическое вмешательство, лучевую терапию и/или генную терапию. В некоторых аспектах химиотерапия представляет собой доцетаксел, паклитаксел, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлорэтамин, циклофосфамид, камптотecin, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитрозомочевину, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин, пликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, связывающие рецепторы эстрогена агенты, таксол, гемцитабин, навелбин, ингибиторы фарнезил-белковой трансферазы, трансплатин, 5-фторурацил, винкристин, винбластин, метотрексат, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления химиотерапия представляет собой таксан, такой

как доцетаксал или паклитаксел. Химиотерапия может быть проведена до, во время, после или их комбинации относительно нейтральной липидной композиции согласно изобретению. Химиотерапия может быть проведена в пределах 0, 1, 5, 10, 12, 20, 24, 30, 48 или 72 ч или больше от композиции нейтрального липида. Композиция нейтрального липида, вторая противораковая терапия или обе - композиция нейтрального липида и противораковая терапия могут быть введены внутриопухолево, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, перорально, или различными их комбинациями.

Предполагается, что любой вариант осуществления, обсуждаемый в данном описании, может быть реализован в отношении любого способа или композиции согласно изобретению, и наоборот. Кроме того, композиции согласно изобретению могут быть использованы для достижения способов согласно изобретению.

Как применяется в данном документе, "по существу свободный" касательно обозначенного компонента используется в данном документе для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно внесен в композицию и/или присутствует только в качестве загрязнителя или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента в результате любого непреднамеренного загрязнения композиции значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой стандартными аналитическими способами не может быть обнаружено какое-либо количество обозначенного компонента.

Как применяется в данном документе, единственное число существительного может означать один или большее количество. Как применяется в данном документе, в формуле, при использовании в комбинации со словом "содержащий" единственное число существительного может означать один или большее количество.

Применение термина "или" в формуле изобретения следует понимать как "и/или", если явно не указано то, что оно относится только к альтернативам или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя раскрытие изобретения поддерживает определение, которое относится только к альтернативам и "и/или". Как применяется в данном документе, "другой" может означать по меньшей мере еще один или больше.

Во всем данном документе термин "около" применяют для указания того, что значение включает в себя вариант ошибки, свойственный устройству, способу, применяемому для определения значения, или вариацию, которая существует среди субъектов исследования.

Другие объекты, признаки и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хоть и указывают на предпочтительные варианты осуществления изобретения, даны только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения будут очевидными для специалиста в данной области техники исходя из данного подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Следующие графические материалы составляют часть данного описания изобретения и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов данного изобретения. Изобретение может быть лучше понято при обращении к одному или большему количеству из этих графических материалов в комбинации с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

Фиг. 1. Ингибирование экспрессии STAT3 с помощью липосомного антисмыслового STAT3 агента. Способность липосомного антисмыслового STAT3 агента ингибировать экспрессию STAT3 была проверена на двух клеточных линиях аденокарциномы легкого, H1975 и HCC 827. Липосомальный антисмысловый STAT3 агент, соответствующий SEQ ID NO: 4 (180 мкг/мл) или эквивалентное количество пустых липосом, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней.

Фиг. 2A-2C. Подавление жизнеспособности клеток немелкоклеточного рака легкого с помощью липосомного антисмыслового STAT3 агента. Способность липосомного антисмыслового STAT3 агента подавлять жизнеспособность клеток немелкоклеточных рака легкого была протестирована на трех клеточных линиях аденокарциномы легкого: H1975 (фиг. 2A), HCC 827 (фиг. 2B) и H358 (фиг. 2C).

Липосомный антисмысловый STAT3 агент, соответствующий одной из SEQ ID NO: 1-4, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней.

Фиг. 3A, 3B. Подавление жизнеспособности клеток лейкемии и лимфомы с помощью липосомного антисмыслового STAT3 агента. Способность липосомного антисмыслового STAT3 агента ингибировать рост клеток лейкемии тестировали на трех линиях клеток лейкемии человека (K-562, MV4-11 и Kasumi-1) (фиг. 3A) и пяти линиях клеток лимфомы человека (DOKN-2), (SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-10 и RL) (фиг. 3B). Липосомный антисмысловый STAT3 агента, соответствующий SEQ ID NO: 4, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

Согласно данному изобретению предложены композиции и способы доставки анти-STAT3 олигонуклеотида (например, ингибитора экспрессии гена) в клетку с помощью липидной композиции, в некоторых аспектах липидной композиции с суммарным зарядом около нуля, т.е. нейтральной липидной

композиции. В некоторых вариантах осуществления липидная композиция представляет собой незаряженную липосому. Эти способы могут быть эффективно использованы для лечения рака или аутоиммунного заболевания.

Липиды и липосомы.

Термин "липосомы" используется в данном документе для обозначения липидсодержащих везикул, имеющих липидный бислой, а также других липидных частиц-носителей, которые могут захватывать или заключать в себя антисмысловые олигонуклеотиды. Как таковая, липосома - это общий термин, охватывающий множество однослойных, многослойных и многоцелевых липидных носителей, образованных в результате создания закрытых липидных бислоев или агрегатов. Кроме того, липосомы могут иметь неопределенную пластинчатую структуру. Липосомы могут быть охарактеризованы как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной двухслойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы имеют множество липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются самопроизвольно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперестройке до образования замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh and Bachhawat, 1991). Однако данное изобретение также охватывает композиции, которые имеют другие структуры в растворе, в отличие от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов молекул липидов.

Липосомы представляют собой форму наночастиц, которые являются носителями для доставки различных лекарств в больную ткань. Оптимальный размер липосом зависит от ткани-мишени. В опухолевой ткани сосудистая сеть является прерывистой, и размеры пор варьируются от 100 до 780 нм (Siwak et al., 2002). Для сравнения, размер пор в нормальной эндотелии сосудов составляет <2 нм в большинстве тканей и 6 нм в посткапиллярных венулах. Считается, что отрицательно заряженные липосомы быстрее удаляются из кровотока, чем нейтральные или положительно заряженные липосомы; однако недавние исследования показали, что тип отрицательно заряженного липида влияет на скорость поглощения липосом ретикулоэндотелиальной системой (RES). Например, липосомы, содержащие отрицательно заряженные липиды, которые не экранированы стерически (фосфатидилсерин, фосфатидная кислота и фосфатидилглицерин), очищаются быстрее, чем нейтральные липосомы. Интересно, что катионные липосомы (1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан [DOTAP]) и комплексы катион-липосома-ДНК более активно связываются и поглощаются эндотелиальными клетками ангиогенных кровеносных сосудов посредством эндоцитоза, чем анионные, нейтральные или стерически стабилизированные нейтральные липосомы (Thurston et al., 1998; Krasnici et al., 2003). Катионные липосомы могут не быть идеальными носителями доставки для опухолевых клеток, потому что поверхностные взаимодействия с опухолевыми клетками создают барьерный эффект для сайта связывания в результате электростатических взаимодействий, ингибируя дальнейшее объединение систем доставки с опухолевыми сфероидными (Kostarelos et al., 2004). Однако нейтральные липосомы, по-видимому, лучше проникают внутрь опухоли. Токсичность специфических липосомных препаратов также вызывает беспокойство. Катионные липосомы вызывают дозозависимую токсичность и воспаление легких, способствуя высвобождению промежуточных активных форм кислорода, и этот эффект более выражен для мультивалентных катионных липосом, чем для моновалентных катионных липосом, таких как DOTAP (Dokka et al., 2000). Нейтральные и отрицательные липосомы, по-видимому, не проявляют токсичности для легких (Guitierrez-Puente et al., 1999). Для катионных липосом, несмотря на эффективный захват нуклеиновых кислот, имеется мало примеров успешного подавления генов *in vivo*, возможно, из-за их стабильной внутриклеточной природы и, как следствие, неспособности высвобождать содержимое - нуклеиновые кислоты. Липиды с нейтральным зарядом или липидные композиции с нейтрализованным зарядом, например 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC), используются в данном документе из-за нейтральных свойств и успеха в доставке антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*.

Согласно данному изобретению предложены способы и композиции для объединения олигонуклеотида, такого как антисмысловый олигонуклеотид, с липидом и/или липосомой. Олигонуклеотид может быть включен в водную внутреннюю часть липосомы, вкраплен в липидный бислой липосомы, присоединен к липосоме через связывающую молекулу, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захваченным в липосому, включенным в комплекс с липосомой, диспергирован в содержащем липид растворе, смешан с липидом, объединен с липидом, содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или образовать комплекс с мицеллой, или иным образом быть связанным с липидом. Композиции, объединенные с липосомами или липосомами/олигонуклеотидами, предложенные в данном документе, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут быть представлены в виде двухслойной структуры, в виде мицелл или в виде "сжатой" структуры. Они также могут просто быть рассеяны в растворе, возможно образуя агрегаты, которые не являются однородными ни по размеру, ни по форме.

Липиды.

Липиды - это жирные вещества, которые могут быть природными или синтетическими. Например, липиды включают в себя жировые капли, которые природным образом встречаются в цитоплазме, а так-

же класс соединений, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды. Примером является липид 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC).

Липидные композиции согласно данному изобретению могут содержать фосфолипиды. В некоторых вариантах осуществления один вид или тип фосфолипида может быть использован в создании липидных композиций, таких как липосомы. В других вариантах осуществления может использоваться больше чем один вид или тип фосфолипида.

Фосфолипиды включают в себя глицерофосфолипиды и некоторые сфинголипиды. Фосфолипиды включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, диолеилфосфатидилхолин ("DOPC"), яичный фосфатидилхолин ("EPC"), дилауроилфосфатидилхолин ("DLPC"), димиристоилфосфатидилхолин ("DMPC"), дипальмитоилфосфатидилхолин ("DPPC"), дистеароилфосфатидилхолин ("DSPC"), диолеилфосфатидилхолин, 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DAPC"), 1,2-диейкосеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин ("DEPC"), 1-миристоил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("MPPC"), 1-пальмитоил-2-миристоил фосфатидилхолин ("PMPC"), 1-пальмитоил-2-стеароил фосфатидилхолин ("PSPC"), 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("SPPC"), пальмитоил-олеил фосфатидилхолин ("POPC"), 1-олеил-2-пальмитоил фосфатидилхолин ("OPPC"), дилауроилфосфатидилглицерин ("DLPG"), димиристоилфосфатидилглицерин ("DMPG"), дипальмитоилфосфатидилглицерин ("DPPG"), дистеароилфосфатидилглицерин ("DSPG"), диолеилфосфатидилглицерин ("DOPG"), димиристоил фосфатидную кислоту ("DMPA"), дипальмитоил фосфатидную кислоту ("DPPA"), дистеароил фосфатидную кислоту ("DSPA"), диолеил фосфатидную кислоту ("DOPA"), димиристоил фосфатидилэтаноламин ("DMPE"), дипальмитоил фосфатидилэтаноламин ("DPPE"), дистеароилфосфатидилэтаноламин ("DSPE"), диолеилфосфатидилэтаноламин ("DOPE"), пальмитоил-олеил фосфатидилэтаноламин ("POPE"), димиристоил фосфатидилсерин ("DMPS"), дипальмитоил фосфатидилсерин ("DPPS"), фосфатидилсерин мозга ("BPS"), дистеароил сфингомиелин ("DSSP"), сфингомиелин мозга ("BSP"), дипальмитоил сфингомиелин ("DPSP"), лизофосфатидилхолин и лизофосфатидилэтаноламин.

Фосфолипиды включают в себя, например, фосфатидилхолины, фосфатидилглицерины и фосфатидилэтаноламины; поскольку фосфатидилэтаноламины и фосфатидилхолины не заряжены в физиологических условиях (т.е. при pH около 7), эти соединения могут быть особенно полезны для получения нейтральных липосом. В некоторых вариантах осуществления фосфолипид DOPC используют для получения незаряженных липосом или липидных композиций. В некоторых вариантах осуществления также может быть использован липид, который не является фосфолипидом (например, холестерин).

Фосфолипиды могут быть из природных или синтетических источников. Однако фосфолипиды из природных источников, такие как фосфатидилхолин из яйца или сои, фосфатидиновая кислота мозга, фосфатидилинозитол из мозга или растения, кардиолипин сердца, и растительный или бактериальный фосфатидилэтаноламин, не применяют в некоторых вариантах осуществления в качестве первичного фосфатида (т.е. составляет 50% или больше общей фосфатидной композиции), поскольку это может привести к нестабильности и утечке образующихся липосом.

Нейтральные липосомы.

"Нейтральные липосомы или липидная композиция" или "незаряженные липосомы или липидная композиция", как применяется в данном документе, определяются как липосомы или липидные композиции, имеющие один или большее количество липидов, которые дают практически нейтральный суммарный заряд (по существу, незаряженные). В некоторых вариантах осуществления нейтральные липосомы или липидные композиции могут содержать в основном липиды и/или фосфолипиды, которые сами по себе являются нейтральными. В некоторых вариантах осуществления амфипатические липиды могут быть включены в или использованы для создания нейтральных липосом или липидных композиций. Например, нейтральная липосома может быть создана путем объединения положительно и отрицательно заряженных липидов, так что эти заряды по существу взаимно компенсируют друг друга, в результате чего получается практически нейтральный суммарный заряд. Под "по существу нейтральным" или "по существу незаряженным" подразумевается, что немногие, если таковые имеются, липиды в данной популяции (например, популяции липосом) содержат заряд, который не компенсируется противоположным зарядом другого компонента (например, меньше чем 10% компонентов содержат некомпенсированный заряд, более предпочтительно меньше чем 5% и наиболее предпочтительно меньше чем 1%). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть приготовлена композиция, в которой липидный компонент композиции является по существу нейтральным, но не в форме липосом.

Размер липосом варьируется в зависимости от способа синтеза. Липосома, суспендированная в водном растворе, в целом, как правило, имеет форму сферического пузырька и может иметь один или большее количество концентрических слоев молекул липидного бислоя. Каждый слой состоит из параллельного массива молекул, представленный формулой XY, где 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 имеют тенденцию к самообъединению. Например, когда внутри липосо-

мы находятся водные фазы, молекулы липида могут образовывать бислои, известный как ламелла, с компоновкой ХУ-УХ. Агрегаты липидов могут формироваться, когда гидрофильные и гидрофобные части более чем одной молекулы липида становятся связанными друг с другом. Размер и форма этих агрегатов будут зависеть от многих различных переменных, таких как природа растворителя и присутствие других соединений в растворе.

Липосомы в пределах объема данного изобретения могут быть приготовлены в соответствии с известными лабораторными методиками, такими как, например, способ Bangham et al. (1965), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки; способ Gregoriadis (1979), содержание которого включено в данный документ посредством ссылки; способ Deamer and Uster (1983), содержание которого включено посредством ссылки; и способ испарения с обращенной фазой, описанный Szoka и Papahadjopoulos (1978). Вышеупомянутые способы различаются по своим соответствующим способностям захватывать водный материал, и их соответствующим соотношениям водного пространства к липиду.

В некоторых вариантах осуществления нейтральная липосома может использоваться для доставки олигонуклеотида, такого как антисмысловой олигонуклеотид. Нейтральная липосома может содержать один вид олигонуклеотидов, направленных 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 химиотерапевтический агент в дополнение к олигонуклеотиду; таким образом, в некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент и олигонуклеотид могут быть доставлены в клетку (например, раковую клетку в человеке-пациенте) в тех же или отдельных композициях.

Высушенные липиды или лиофилизированные липосомы могут быть обезвожены и восстановлены с помощью подходящей концентрации подходящего растворителя (например, буфером DPBS или Hepes). Затем смесь может быть активно перемешана в вихревом смесителе. Липосомы могут быть ресуспендированы при соответствующей концентрации общего фосфолипид (например, около 10-200 мМ). Неинкапсулированный олигонуклеотид может быть удален центрифугированием при 29000 g, а липосомные осадки промыты. В альтернативном варианте неинкапсулированные олигонуклеотиды могут быть удалены путем диализа против избытка растворителя. Количество инкапсулированного олигонуклеотида может быть определено с помощью стандартных способов.

Ингибирование экспрессии генов.

Ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать транскрипцию или трансляцию гена в клетке. Длина олигонуклеотида может составлять от 5 до 50 или больше нуклеотидов, а в некоторых вариантах от 7 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может иметь длину 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. Олигонуклеотид может содержать нуклеиновую кислоту и/или аналог нуклеиновой кислоты. Как правило, ингибирующий олигонуклеотид будет ингибировать трансляцию одного гена в клетке; однако в некоторых вариантах осуществления ингибирующий олигонуклеотид может ингибировать трансляцию больше чем одного гена внутри клетки.

Внутри олигонуклеотида компоненты олигонуклеотида необязательно должны быть одного и того же типа или гомогенными на всем его протяжении (например, олигонуклеотид может содержать нуклеотид и нуклеиновую кислоту или аналог нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления 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 больше смежных нуклеиновых оснований, включая все диапазоны между ними, которые гибридизируются с комплементарной нуклеиновой кислотой с образованием двухцепочечной структуры.

Нуклеиновые кислоты.

Согласно данному изобретению предложены способы и композиции для доставки олигонуклеотида с помощью нейтральных липосом. Поскольку олигонуклеотид состоит из нуклеиновой кислоты, способы, относящиеся к нуклеиновым кислотам (например, продуцирование нуклеиновой кислоты, модификация нуклеиновой кислоты и т. д.), также могут быть использованы в отношении олигонуклеотида.

Термин "нуклеиновая кислота" хорошо известен в данной области техники. Термин "нуклеиновая кислота", как применяется в данном документе, обычно относится к молекуле (т.е. цепи) ДНК, РНК или ее производному или аналогу, что содержит нуклеиновое основание. Эти определения относятся к одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоте. Двухцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть образованы полностью комплементарным связыванием; однако в некоторых вариантах осуществления двухцепочечная нуклеиновая кислота может быть образована путем частичного или достаточного комплементарного связывания. Как применяется в данном документе, термин "одноцепочечная нуклеиновая кислота" может обозначаться префиксом "оц", а двухцепочечная нуклеиновая кислота - префиксом "дц".

Нуклеиновые основания.

Как применяется в данном документе, термин "нуклеиновое основание" относится к гетероцикли-

ческому основанию, такому как, например, встречающееся в природе нуклеиновое основание (т.е. А, Т, G, С или U), найденное по меньшей мере в одной встречающейся в природе нуклеиновой кислоте (т.е. ДНК и РНК), а также встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе производные и аналоги такого нуклеинового основания. Нуклеиновое основание, как правило, может образовывать одну или большее количество водородных связей (т.е. "отжигаться" или "гибридизироваться") по меньшей мере с одним природным нуклеиновым основанием таким образом, что может заменить встречающиеся в природе пары нуклеиновых оснований (например, образование водородных связей между А и Т, G и С и А и U). Нуклеиновое основание может быть помещено в нуклеозид или нуклеотид с использованием любого способа химического или естественного синтеза, описанного в данном документе или известного специалисту в данной области техники.

"Пуриновое" и/или "пиримидиновое" нуклеиновое основание(я) охватывают встречающиеся в природе пуриновые и/или пиримидиновые нуклеиновые основания, а также их производные и аналоги, включая, но не ограничиваясь лишь этими, пурин или пиримидин, замещенный одним или большим количеством алкильных, карбоксиалкильных, аминов, гидроксильных, галогеновых (т.е. фторо, хлоро, бромо или йодо), тиоловых или алкилтиоловых фрагментов. Предпочтительные алкильные (например, алкильные, карбоксиалкильные и т.д.) фрагменты содержат от около 1, около 2, около 3, около 4, около 5 до около 6 атомов углерода. Другие неограничивающие примеры пурина или пиримидина включают в себя деазапурин, 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-бром урацил, 5-этилурацил, 5-йодурацил, 5-хлораурацил, 5-пропилурацил, тиоурацил, 2-метиладенин, метилтиоаденин, N,N-диметиладенин, азаадинины, 8-бромаденин, 8-гидроксиаденин, 6-гидроксиаминопурин, 6-тиопурин, 4-(6-аминогексил/цитозин) и т.п.

Пуриновые и пиримидиновые производные или аналоги включают в себя, но не ограничиваются лишь этими (аббревиатура/описание модифицированного основания):

ac4c/4-ацетилцитидин, Mam5s2u/5-метоксиаминометил-2-тиоуридин,
 Chm5u/5-(карбоксигидроксиметил)уридин, Man q/Beta, D-маннозилквеозин,
 Cm/2'-О-метилцитидин, Mcm5s2u/5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин,
 Cmnm5s2u/5-карбоксиметиламин-метил-2-тиоуридин, Mcm5u/5-метоксикарбонилметилуридин,
 Cmnm5u/5-карбоксиметиламинметилуридин, Mo5u/5-метоксиуридин,
 D/Дигидроуридин, Ms2i6a, 2-метилтио-N6-изопентениладенозин, Fm/2'-О-метилпсевдоуридин,
 Ms2t6a/N-((9-бета-D-рибофуранозил-2-метилтиопурин-6-ил)карбомойл)треонин,
 Gal q/Beta, D-галактозилквеозин,
 Mt6a/N-((9-бета-D-рибофуранозилпурин-6-ил)-N-метилкарбомойл)треонин,
 Gm/2'-О-метилгуанозин, Mv/Уридин-5-метиловый эфир оксисукусной кислоты,
 I/Инозин, o5u/Уридин-5-оксисукусная кислота (v), I6a/N6-изопентениладенозин,
 Osyw/Вибутоксоин, m1a/1-метиладенозина, P/Псевдоуридин,
 m1f/1-метилпсевдоуридин, Q/Квеозин, m1g/1-метилгуанозин,
 s2c/2-тиоцитидин, m1l/1-метилюридин, s2t/5-метил-2-тиоуридин,
 m22g/2,2-диметилгуанозин, s2u/2-тиоуридин, m2a/2-метиладенозин,
 s4u/4-тиоуридин, m2g/2-метилгуанозин, T/5-метилуридин, m3c/3-метилцитидин,
 t6a/N-((9-бета-D-рибофуранозилпурин-6-ил)карбомойл)треонин,
 m5c/5-метилцитидин, Tm/2'-О-метил-5-метилуридин, m6a/N6-метиладенозин,
 Um/2'-О-метилуридин, m7g/7-метилгуанозин, Yw/Вибутозин,
 Mam5u/5-метиламинометилуридин или X/3-(3-амино-3-карбоксипропил)уридин, (аср3)u.
 Нуклеозиды.

Как применяется в данном документе, "нуклеозид" относится к отдельной химической единице, содержащей нуклеиновое основание, ковалентно присоединенное к линкерному фрагменту нуклеинового основания. Неограничивающим примером "нуклеиново-линкерного фрагмента" является сахар, содержащий 5 атомов углерода (т.е. "5-углеродный сахар"), включая, но не ограничиваясь лишь этими, дезоксирибозу, рибозу, арабинозу или производное или аналог 5-углеродного сахара. Неограничивающие примеры производного или аналога 5-углеродного сахара включают в себя 2'-фтор-2'-дезоксирибозу или карбоциклический сахар, где углерод замещен атомом кислорода в сахарном кольце. Как применяется в данном документе, "фрагмент" обычно относится к меньшему химическому или молекулярному компоненту большей химической или молекулярной структуры.

В данной области техники известны различные типы ковалентного(ых) присоединения(ий) нуклеинового основания к линкерному фрагменту нуклеинового основания. В качестве неограничивающего примера нуклеозид, содержащий пурин (т.е. А или G) или 7-деазапурин нуклеиновое основание, обычно содержит ковалентное присоединение позиции 9 пурина или 7-деазапурина к позиции 1' 5-углеродного сахара. В другом неограничивающем примере, нуклеозид, содержащий пиримидиновое нуклеиновое основание (т.е. С, Т или U), обычно содержит ковалентное присоединение позиции 1 пиримидина к позиции 1' сахара с 5 атомами углерода (Kornberg and Baker, 1992).

Нуклеотиды.

Как применяется в данном документе, "нуклеотид" относится к нуклеозиду, дополнительно содержащему "связь остова". Связь остова, как правило, ковалентно присоединяет нуклеотид к другой молекуле, содержащей нуклеотид, или к другому нуклеотиду с образованием нуклеиновой кислоты. "Связь остова" природных нуклеотидов обычно содержит фосфатную группу (например, фосфодиэфирную связь остова), которая ковалентно присоединена к 5-углеродному сахару. Присоединение фрагмента остова обычно происходит в 3'- или 5'-позиции 5-углеродного сахара. Однако в данной области техники известны другие типы присоединений, в частности, когда нуклеотид содержит производные или аналоги встречающегося в природе 5-углеродного сахарного или фосфатного фрагмента.

Аналоги нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может содержать или состоять полностью из производного или аналога нуклеинового основания, линкерной части нуклеинового основания и/или связи остова, что может присутствовать в природной нуклеиновой кислоте. Как применяется в данном документе, "производное" относится к химически модифицированной или измененной форме встречающейся в природе молекулы, в то время как термины "имитирующий" или "аналог" относятся к молекуле, которая может напоминать или может не напоминать структурно встречающуюся в природе молекулу или фрагмент, но обладает похожими функциями. Нуклеиновые, нуклеозидные 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 со связью остова, включают в себя те, что

в патенте США № 5681947, который описывает олигонуклеотиды, содержащие производные пурина, которые формируют тройные спирали с и/или предотвращают экспрессию дцДНК;

в патентах США № 5652099 и 5763167, которые описывают нуклеиновые кислоты, содержащие флуоресцентные аналоги нуклеозидов, обнаруженных в ДНК или РНК, в частности, для использования в качестве флуоресцентных зондов нуклеиновых кислот;

в патенте США № 5614617, который описывает аналоги олигонуклеотидов с заменами на пиримидиновых кольцах, которые обладают повышенной нуклеазной стабильностью;

в патентах США № 5670663, 5872232 и 5859221, которые описывают аналоги олигонуклеотидов с модифицированными 5-углеродными сахарами (т.е. модифицированными 2'-дезоксифуранозил фрагментами), используемыми в обнаружении нуклеиновой кислоты;

в патенте США № 5446137, который описывает олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере один фрагмент 5-углеродного сахара, замещенный в позиции 4' заместителем, отличным от водорода, которые могут быть использованы в гибридизационных анализах;

в патенте США № 5886165, который описывает олигонуклеотиды как с дезоксирибонуклеотидами с 3'-5' связями остова, так и с рибонуклеотидами с 2'-5' связями остова;

в патенте США № 5714606, который описывает модифицированную связь остова, причем кислород в 3'-позиции связи остова заменяют атомом углерода, чтобы увеличить устойчивость нуклеиновых кислот к нуклеазам;

в патенте США № 5672697, который описывает олигонуклеотиды, содержащие одну или большее количество 5'-метилфосфонатных связей остова, которые увеличивают устойчивость к нуклеазам;

в патентах США № 5466786 и 5792847, которые описывают присоединение замещающего фрагмента, который может содержать лекарственный агент или метку, к 2' углероду олигонуклеотида, чтобы обеспечить увеличенную нуклеазную стабильность и способность доставлять лекарства или фрагменты обнаружения;

в патенте США № 5223618, который описывает аналоги олигонуклеотидов с 2 или 3 карбоновыми связями остова, соединяющими 4' позицию и 3' позицию соседнего фрагмента 5-углеродного сахара для увеличения клеточного поглощения, устойчивости к нуклеазам, и гибридизации с мишенью РНК;

в патенте США № 5470967, который описывает олигонуклеотиды, содержащие по меньшей мере одну сульфаматную или сульфамидную связь остова, которые являются полезными в качестве гибридизационных зондов нуклеиновых кислот;

в патентах США № 5378825, 5777092, 5623070, 5610289 и 5602240, которые описывают олигонуклеотиды с трех- или четырех-атомным мостиком связи остова, замещающим фосфодиэфирную связь остова, используемым для улучшения устойчивости к нуклеазам, клеточного поглощения и регуляции экспрессии РНК;

в патенте США № 5858988, который описывает гидрофобный агент-носитель, присоединенный к позиции 2'-О олигонуклеотидов для повышения их способности проникать через мембрану и стабильности;

в патенте США № 5214136, который описывает олигонуклеотиды, конъюгированные с антрахиноном на 5'-конце, которые обладают усиленной гибридизацией с ДНК или РНК; повышенной устойчивостью к нуклеазам;

в патенте США № 5700922, который описывает химеры ПНК-ДНК-ПНК, в которых ДНК содержит 2'-дезоксизитро-пентофуранозильные нуклеотиды для увеличения устойчивости к нуклеазам, аффин-

ности связывания, а также способности активировать РНКазу Н;

в патенте США № 5708154, который описывает РНК, соединенную с ДНК с образованием гибрида ДНК-РНК;

в патенте США № 5908845, который описывает полиэфирные нуклеиновые кислоты, в которых одно или большее количество нуклеиновых оснований соединены с хиральными атомами углерода в основной цепи полиэфира;

в 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 пептида; или PENAM), которые, как правило, содержат один или большее количество нуклеотидов или нуклеозидов, которые содержат фрагмент нуклеинового основания, фрагмент нуклеинового линкера, который не является 5-углеродным сахаром (например, аза атомы азота, амидо и/или уреидо соединения), и/или связь остова, которая не является фосфатной связью остова (например, аминоктилглициновая, полиамидная, полиэтиленовая, политиоамидная, полисульфинамидная или полисульфонамидная связь остова); и

в патенте США № 5855911, который описывает гидрофобную, устойчивую к нуклеазам Р-этоксидная связь остова.

Другие модификации и применения аналогов нуклеиновых кислот известны в данной области техники, и ожидается, что эти методы и типы аналогов нуклеиновых кислот могут быть использованы с данным изобретением.

Приготовление нуклеиновых кислот.

Нуклеиновую кислоту можно получить любым методом, известным специалисту в данной области техники, таким как химический синтез, ферментативное или биологическое изготовление. Неограничивающие примеры синтетической нуклеиновой кислоты (например, синтетического олигонуклеотида) включают в себя нуклеиновую кислоту, полученную химическим синтезом *in vitro* с использованием фосфотриэфирных, фосфитных или фосфорамидитных химических и твердофазных методов, таких как описанные в EP 266032, который включен в данный документ посредством ссылки, или с помощью дезоксинуклеозидных Н-фосфонатных промежуточных соединений, как описано Froehler et al. (1986) и в патенте США № 5705629, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. В способах согласно данному изобретению может быть использован один или большее количество видов олигонуклеотидов. Различные механизмы синтеза олигонуклеотидов были раскрыты, например, в патентах США № 4659774, 4816571, 5141813, 5264566, 4959463, 5428148, 5554744, 5574146, 5602244, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Очистка нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота может быть очищена на полиакриламидных гелях, центрифугированием в градиентах хлорида цезия или любыми другими способами, известными специалисту в данной области техники (см., например, Sambrook et al. (2001), включенный в данный документ посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. Как применяется в данном документе, термин "выделенная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (например, молекуле РНК или ДНК), которая была отделена от, или другим путем очищена от, основной массы геномных и транскрибированных нуклеиновых кислот одной или большего количества клеток. В некоторых вариантах осуществления "выделенная нуклеиновая кислота" относится к нуклеиновой кислоте, которая была отделена от или другим путем очищена от совокупной массы клеточных компонентов или реакционных компонентов *in vitro*, таких как, например, макромолекулы, такие как липиды или белки, малые биологические молекулы и т.п.

Гибридизация.

Как применяется в данном документе, "гибридизация", "гибридизировать" или "способный к гибридизации" обозначают образование двух- или трехцепочечной молекулы или молекулы с частичной двух- или трехцепочечной природой. Как применяется в данном документе, "отжиг" является синонимом "гибридизировать".

Как применяется в данном документе, "жесткие условия" или "высокой жесткости" представляют собой такие условия, которые допускают гибридизацию между или в пределах одной или больше цепей нуклеиновой кислоты, содержащих комплементарную последовательность(и), но исключают гибридизацию случайных последовательностей. Жесткие условия допускают небольшое несоответствие между нуклеиновой кислотой и цепью-мишенью, если таковые имеются. Такие условия хорошо известны специалистам в данной области техники и являются предпочтительными для применений, требующих высокой селективности.

Жесткие условия могут включать в себя условия с низкой концентрацией соли и/или высокой температурой, такие как обеспечение от около 0,02 до около 0,15 M NaCl при температурах от около 50 до около 70°C. Понятно, что температура и ионная сила желаемой строгости частично определяются длиной конкретной нуклеиновой кислоты(кислот), длиной и нуклеотидным составом последовательности(ей)-мишени, составом заряда нуклеиновой кислоты(кислот) и присутствием или концентрацией формамида,

тетраметиламмонийхлорида или другого растворителя(ей) в гибридизационной смеси.

Также понятно, что эти диапазоны, композиции и условия для гибридизации упоминаются только в качестве неограничивающих примеров и что желаемая жесткость для конкретной реакции гибридизации часто определяется эмпирически путем сравнения с одним или большим количеством положительных или отрицательных контролей. В зависимости от предполагаемого применения предпочтительно использовать различные условия гибридизации для достижения различных степеней селективности нуклеиновой кислоты по отношению к последовательности-мишени. В неограничивающем примере идентификация или выделение родственной нуклеиновой кислоты-мишени, которая не гибридизуется с нуклеиновой кислотой в жестких условиях, могут быть достигнуты путем гибридизации при низкой температуре и/или высокой ионной силе. Такие условия называются "низкой жесткостью" или "условиями низкой жесткости", и неограничивающие примеры низкой жесткости включают в себя гибридизацию, проводимую при от около 0,15 до около 0,9 М NaCl в диапазоне температур от около 20 до около 50°C. Конечно, специалист в данной области техники может дополнительно модифицировать условия низкой или высокой жесткости для соответствия конкретному применению.

Способ получения липосомного Р-этоксидантисмыслового лекарственного продукта.

Антисмысловые олигонуклеотиды (олиго), комплементарные определенным участкам мРНК-мишени, использовали для ингибирования экспрессии эндогенных генов. Когда антисмысловые олигонуклеотиды связываются с мРНК-мишенью, образуется гибрид ДНК-РНК. Эта гибридная конструкция ингибирует трансляцию мРНК и, таким образом, экспрессию кодируемого белка. Если белок необходим для выживания клетки, ингибирование его экспрессии может привести к гибели клетки. Следовательно, антисмысловые олигонуклеотиды могут быть полезными инструментами в противораковой и противовирусной терапии.

Основными препятствиями в использовании антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования экспрессии генов являются нестабильность клеток, низкое поглощение клетками и плохая межклеточная доставка. Природные фосфодиэфиры не устойчивы к нуклеазному гидролизу; таким образом, необходимы высокие концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, прежде чем будет наблюдаться какой-либо ингибирующий эффект. Модифицированные аналоги фосфодиэфиров, такие как Р-этоксиды, были сделаны для преодоления этой проблемы нуклеазного гидролиза, но они не предоставили удовлетворительного решения задачи.

Клеточное поглощение антисмысловых олигонуклеотидов является низким. Чтобы решить эту проблему, физические методы, такие как осаждение фосфатом кальция, опосредование DEAE-декстраном или электропорация, были использованы для увеличения клеточного поглощения олигонуклеотидов. Эти методы трудно воспроизвести и не применимы *in vivo*. Катионные липиды, такие как липофектин, также используются для доставки олигонуклеотидов. Между катионными липидами и отрицательно заряженными олигонуклеотидами формируется электростатическое взаимодействие, что приводит к образованию комплекса, который затем поглощается клетками-мишенями. Поскольку эти катионные липиды не защищают олигонуклеотиды от расщепления нуклеазами и вредны для клеточной мембраны, они полезны только для доставки устойчивых к нуклеазам фосфоротиоатов, но не расщепляемых нуклеазами фосфодиэфиров.

Другой модифицированный аналог фосфодиэфира, который был получен, представляет собой Р-этоксид. Р-этоксид-антисмысловый остов не оказывает неблагоприятного воздействия на кровотоки и активацию комплемента, которые являются некоторыми из токсических эффектов, которые были зарегистрированы для других антисмысловых аналогов. Модификации Р-этоксид олигонуклеотидов выполняются в фосфатном остове, так что модификация не будет препятствовать связыванию этих олигонуклеотидов с мРНК-мишенью. Р-этоксид олигонуклеотиды получают путем добавления этильной группы к не мостиковому атому кислорода фосфатного остова, что делает эти олигонуклеотиды незаряженными соединениями. Несмотря на их устойчивость к нуклеазам, клеточное поглощение и внутриклеточная доставка Р-этоксид олигонуклеотидов является плохой, поскольку при интернализации эти олигонуклеотиды остаются блокированными внутри эндосомных/лизосомальных вакуолей, что затрудняет их доступ к мРНК-мишени.

Р-этоксид-антисмысловый лекарственный препарат.

Липосомальный Р-этоксид-антисмысловый лекарственный продукт состоит из двух продуктов cGMP, оба из которых имеют требуемый FDA сертификат анализа с одобренными FDA критериями выпуска. Сырье, растворители и конечный лекарственный продукт описаны в данном документе. При изготовлении лекарственный продукт представляет собой лиофилизированный кристалл или порошок янтарного или белого цвета, который содержит следующие материалы: олигонуклеотид (например, антисмысловое Р-этоксид лекарственное вещество), нейтральные липиды (например, DOPC) и поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20). При приготовлении для введения пациенту в пробирку добавляют физиологический раствор, и в это время формируются липосомы с Р-этоксид антисмысловым агентом, который помещен в внутреннее пространство липосомы.

Р-этоксид-антисмысловое лекарственное вещество.

Конкретные физические свойства (например, растворимость и гидрофобность, которые затем влия-

ют на растворимость лекарственного продукта в физиологическом растворе, включение олиго в липосомы и размер липосомных частиц) готового продукта могут быть определены с использованием заранее определенной смеси сырьевого материала Р-этоксид и фосфодиэфирного амидита, при производстве Р-этоксид-антисмысловой лекарственной субстанции. Хотя потеря группы Р-этоксид остова происходит случайным образом во время получения олигонуклеотидов, что дает фосфодиэфирные связи в этих звеньях, эта потеря не может создавать желаемое соотношение Р-этоксид:фосфодиэфирных связей остова внутри олигонуклеотида. В этом случае, смесь сырьевых материалов Р-этоксид и фосфодиэфирного амидита дополняет ожидаемую величину делеций Р-этоксид остова, таким образом создавая олигонуклеотид с желаемым соотношением. Увеличение количества молекул Р-этоксид в остова олигонуклеотида приводит к тому, что молекула становится более гидрофобной (что дает более крупные липосомные частицы; табл. 1), менее полярной и менее растворимой (табл. 2). Способы тестирования нейтрального по заряду гидрофобного Р-этоксид лекарственного вещества включают в себя масс-спектрометрию для определения распределения длин олигонуклеотидов, и анализы для определения растворимости лекарственного вещества, которое для практических целей растворимости представляет собой визуальный осмотр лекарственного продукта, восстановленного в физиологическом растворе. Поскольку олигонуклеотид становится менее растворимым из-за большего количества связей Р-этоксид остова, восстановленный раствор становится более белым, пока образуются частицы, так как гидрофобность становится слишком высокой.

Готовая форма должна использовать размер частиц, среди которых 90% имеет размер менее 5000 нм, и является растворимой, что является функцией нуклеотидной композиции. Например, если длина олигонуклеотида составляет 18-20 нуклеотидов, то по меньшей мере пять фосфатных связей остова должны быть фосфодиэфирными связями остова. Это подтверждается экспериментами 7-10, приведенными в табл. 1, в которой приведены данные по 18-мерным олигонуклеотидам. При этом, если длина олигонуклеотида составляет 25 нуклеотидов, то по меньшей мере шесть фосфатных связей остова должны быть фосфодиэфирными связями остова.

Таблица 1

Изменчивость размера липосомных частиц с композицией остова
антисмыслового агента

		Удаление этила остова после производства		Характеристики размера частиц: Кумулятивная функция распределения		
		Основной пик ^d	Делеция смеси ^e	90% значение (нм) **	50% значение (нм)	300 нм значен ие (%)
Экспери -мент	Скон- струиро- ванный остов анти- смыслового агента					
1	3-ех амидитное замещение	-6	-5,67	2130	911	15,30
2	3-ех	-6	-5,67	2420	1004	15,50

	амидитное замещение					
3	3-ех амидитное замещение	-6	-6,12	3682	+943	15,50
4	3-ех амидитное замещение	-7	-6,66	3805	+978	14,60
5	100% Р-этоксид	-5	-5,66	3924	+976	16,00
6	2-ух амидитное замещение	-5	-5,32	4387	1888	11,60
7 ^a	100% Р-этоксид	-4	-4,22	5057	1131	17,70
8	100% Р-этоксид	-4	-4,52	5659	1359	10,00
9 ^b	100% Р-этоксид	-4	-4,38	7571	1909	2,60
10 ^c	100% Р-этоксид	-4	-4,38	7994	1653	14,40

** Критерий выпуска лекарственного средства для 90% липосомных частиц должен составлять меньше чем или быть равным 5000 нм.

^a Эта партия была отброшена из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловые частицы в восстановленном растворе.

^b Эта партия имела более низкий объем DMSO и tBA с 2 мг антисмыслового агента во флаконе объемом 20 мл, что добавило дополнительный компонент для увеличения липосом.

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

^d Основной пик представляет собой наиболее распространенное число делеций Р-этоксид в популяции олигонуклеотидов.

^e Делеция смеси представляет собой среднее количество делеций Р-этоксид в популяции олигонуклеотидов.

Таблица 2

**Растворимость липосомных частиц с композицией остова
антисмыслового агента**

Эксперимент	Сконструированный остов антисмыслового агента	Удаление этила остова после производства		Растворимость лекарственного агента	
		Основной пик	Делеция смеси ^c	Визуальное наблюдение **	Оценка растворимости
1	3-ех амидитное замещение	-6	-5,67	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
2	3-ех амидитное замещение	-6	-5,67	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
3	3-ех амидитное замещение	-6	-6,12	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
4	3-ех амидитное замещение	-7	-6,66	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
5	100% Р-этокси	-5	-5,66	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
6	2-ух амидитное замещение	-5	-5,32	раствор имеет вид обезжиренного молока	хорошая
7	100% Р-этокси	-4	-4,52	белый раствор	удовлетворительная
8 ^b	100% Р-этокси	-4	-4,38	белый	удовлетворительная
				раствор	удовлетворительная
9 ^c	100% Р-этокси	-4	-4,38	белый раствор	удовлетворительная
10 ^a	100% Р-этокси	-4	-4,22	частицы белого раствора	не подходит

** Если в образце лекарственного препарата есть частицы, партия будет отклонена.

^a Эта партия была отброшена из-за плохой растворимости; в частности, антисмысловые частицы в восстановленном растворе.

^b Эта партия имела более низкий объем DMSO и tBA с 2 мг антисмыслового агента во флаконе объемом 20 мл, что добавило дополнительный компонент для увеличения липосом.

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

Приготовление, фильтрация и лиофилизация липосомного Р-этоксид-антисмыслового лекарственного продукта.

1 г олиго рЕ растворяют в DMSO в соотношении 10 мг олигонуклеотида на 1 мл DMSO. Затем DOPC добавляют к трет-бутиловому спирту в соотношении 1 г DOPC на 1719 мл трет-бутилового спирта. Олиго и DOPC объединяют и смешивают в соотношении 1 г олигонуклеотида на 2,67 г DOPC. Затем к смеси добавляют 20 мл 0,835% (об./об.) раствора полисорбата 20, в результате чего конечная концентрация составляет 0,039 мг/мл. Раствор пропускают через стерильный фильтр до разлива в стеклянные флаконы для лиофилизации.

Влияние поверхностно-активного вещества на размер липосомных частиц определяли путем титрования количества поверхностно-активного вещества (табл. 3). В отсутствие полисорбата 20, только 2,8% частиц имели диаметр 300 нм или меньше. В присутствии 1× полисорбата 20, 12,5% частиц имели диаметр 300 нм или меньше. При добавлении 3×-10× полисорбата 20 около 20% частиц имели диаметр 300 нм или меньше. Таким образом, увеличение количества поверхностно-активного вещества от 1× до 3× приводит к уменьшению размера частиц.

Таблица 3

Изменчивость размера липосомных частиц с применением ПАВ

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%

** Критерий выпуска лекарственного средства для 90% липосомных частиц должен составлять меньше чем или быть равным 5000 нм.

Приготовление липосомного Р-этоксид-антисмыслового лекарственного продукта для введения.

Лиофилизированный препарат гидратировали нормальным физиологическим раствором (0,9%/10 mM NaCl) до конечной концентрации олиго 10-5000 мкМ. Липосомальные-Р-этоксид-олиго смешивали путем ручного встряхивания.

Способы тестирования липосомного Р-этоксид-антисмыслового лекарственного продукта.

Визуальный осмотр изготовленного лекарственного продукта.

После изготовления отбирается пробный флакон, содержащий лекарственный продукт, и проводится визуальный осмотр. Отсутствие жидкости является обязательным, и тогда являются приемлемыми янтарные кристаллы на дне флакона, и приемлемость возрастает с переходом к белому, хлопьевидному порошку или внешнему виду, что является наилучшим результатом. Белый внешний вид указывает на лучший процесс сушки с высоким отношением площади поверхности к массе, что очень способствует восстановлению для использования.

Визуальный осмотр восстановленного лекарственного агента, готового для пациента IV: Нормальный физиологический раствор добавляют в ампулу, содержащую изготовленный липосомный антисмысловый Р-этоксид лекарственный продукт, и встряхивают для восстановления в виде раствора с полностью растворенным кристаллом или порошком лекарственного агента. Выполняют три основных наблюдения:

- 1) чтобы кристалл или порошок полностью растворялись,
- 2) отсутствуют белые сгустки нерастворенного материала и
- 3) внешний вид является молочно-белым или выглядит как обезжиренное молоко.

Чем синее выглядит восстановленная жидкость, тем лучше, поскольку это сигнализирует о меньшем размере липосомных частиц, который отражает свет в синем спектре.

Масс-спектрометрия: Масс-спектрометрия (масс-спектры) используется для отображения профиля различных масс в образце. Когда производится антисмысловый Р-этоксид-материал, для образца проводится масс-спектрометрическое исследование. Результат демонстрирует пики материала, присутствующего на сетке, который имеет увеличивающуюся массу на оси "х" вправо, и относительное содержание по массам на оси "у", возрастающее по восходящей. Профиль из образца анализируют для определения относительного количества Р-этоксид остовов в Р-этоксид образце, признавая, что профиль пиков представляет собой (начиная с самого дальнего правого) полноразмерный материал со всеми остовами, состоящими из Р-этоксид связи, следующий пик слева полноразмерный с одним остовом с делецией

Р-этоксиды (и, следовательно, удален этил, и в результате получается нормальная фосфодиэфирная связь остова) и т.д. Паттерн масс-спектров, смещенный вправо, представляет образец Р-этоксидов, имеющий большее количество Р-этоксидов и, следовательно, имеющий свойства быть более гидрофобным и менее растворимым; и аналогичным образом смещение влево имеет противоположные эффекты. Проверка масс-спектрометрической диаграммы образца также может использоваться для определения того, оказывает ли фильтрация во время производства какое-либо неблагоприятное воздействие на композицию олигонуклеотидов, представленную в отфильтрованном лекарственном продукте.

УФ-тестирование: Тестирование ультрафиолетовым светом используется для определения массы олигонуклеотида, присутствующего в образце. Олигонуклеотиды поглощают свет в диапазоне 260 нм. В результате УФ-тестирование готового восстановленного лекарственного продукта стало использоваться в качестве способа определения количества олигонуклеотидного лекарственного вещества во флаконе с лекарственным препаратом. С точки зрения развития производства и инноваций УФ-тестирование использовалось, чтобы определить, имеются ли проблемы, возникающие во время фильтрации на производстве, или плохая растворимость Р-этоксид-антисмыслового лекарственного вещества, что приводило к меньшему количеству олигонуклеотидов в растворе и, следовательно, более низким показаниям УФ. Способ будет проверен и, вероятно, станет частью окончательного тестирования продукта.

Размер липосомных частиц: флакон готового лекарственного продукта разбавляют до исходной концентрации и тестируют на размер липосомных частиц. Результатом часто является грубое нормальное распределение, имеющее центральную точку, хвосты и средние значения, или грубое нормальное распределение большинства частиц и меньшие вторичные пики меньших липосомных частиц, получаемых в результате эффектов формирования частиц второго порядка. Важно, чтобы липосомные частицы не были слишком большими, поскольку они могут вызывать побочные эффекты у пациентов (например, создавать проблемы с кровотоком в небольших кровеносных сосудах в легких). В результате, критерий выпуска лекарственного продукта включает в себя тестирование размера частиц, демонстрирующее, что 90% липосом имеют размер 5 мкм или меньше. Кроме того, более мелкие липосомы являются предпочтительными, потому что они будут лучше поглощаться клетками, и, во-вторых, более мелкие липосомы могут проникать в поры сосудов, тем самым позволяя липосомам проникать внутрь опухолей, повышая эффективность лечения липосомным Р-этоксид-антисмысловым лекарственным продуктом.

Способы лечения.

Согласно определенным аспектам данного изобретения предложен олигонуклеотид-липидный комплекс (например, олигонуклеотид, включенный 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 к субъекту терапевтического агента, или выполнению процедуры или способа лечения для субъекта с целью получения терапевтической пользы при заболевании или патологии, связанной со здоровьем. Например, лечение может включать в себя введение фармацевтически эффективного количества комплекса олигонуклеотид-липид.

"Субъект" и "пациент" относятся к человеку или не человеку, например примату, млекопитающему, и позвоночным. В конкретных вариантах осуществления субъект является человеком.

Термин "терапевтическая польза" или "терапевтически эффективный", как применяется во всем данном описании, относится ко всему, что способствует или улучшает самочувствие субъекта при лечении такой патологии. Это включает в себя, но не ограничивается лишь этим, снижение частоты или тяжести признаков или симптомов заболевания. Например, лечение рака может включать в себя, например, уменьшение размера опухоли, уменьшение инвазивности опухоли, снижение скорости роста рака или предотвращение метастазирования. Лечение рака может также относиться к продлению выживаемости субъекта с раком. Лечение аутоиммунного заболевания может включать в себя, например, снижение экспрессии аутоантигена, против которого возникает нежелательный иммунный ответ, индукцию толерантности к аутоантигену, против которого существует нежелательный иммунный ответ, или ингибирование иммунного ответа в отношении аутоантигена. Лечение инфекционного заболевания может включать в себя, например, устранение инфекционного агента, снижение уровня инфекционного агента или поддержание уровня инфекционного агента на определенном уровне.

Опухоли, для которых полезны данные способы лечения, включают в себя любые типы злокачественных клеток, такие как те, что обнаружены в солидной опухоли, гематологической опухоли, метастатическом раке или неметастатическом раке. Иллюстративные солидные опухоли могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этими, 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, меланомы, предстательной железы, и груди. Типичные гематологические опухоли включают в себя опухоли костного мозга, злокачественные опухоли из Т- или В-лимфоцитов, лейкомии, лимфомы, такие как, например, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, бластомы,

миеломы и т.п. Дополнительные примеры видов рака, которые можно лечить с помощью способов, предложенных в данном документе, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими, карциному, лимфому, бластому, саркому, лейкоз, плоскоклеточный рак, рак легкого (в том числе мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, гастриальный или желудочный рак (в том числе желудочно-кишечный рак и рак желудочно-кишечной стромы), рак поджелудочной железы (в том числе аденокарциному протоков поджелудочной железы), глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, почечный рак или рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, различные виды рака головы и шеи, меланому, поверхностно распространяющуюся меланому, лентиго злокачественную меланому, периферические пятнистые меланомы, узелковые меланомы, а также В-клеточную лимфому (в том числе низкой степени/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ; промежуточной степени/фолликулярную НХЛ; промежуточной степени диффузную НХЛ; высокой степени иммунобластную НХЛ; высокой степени лимфобластную НХЛ; высокой степени мелкоклеточную с не расщепленным ядром клеток НХЛ; НХЛ с массивной лимфаденопатией; диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому; лимфому клеток мантии; лимфому, связанную с СПИД; и макроглобулинемию Вальденстрема), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и хронический миелобластный лейкоз.

Рак может специфически быть следующего гистологического типа, хотя и не ограничивается лишь этими: новообразование, злокачественный; карцинома; недифференцированный; гигантоклеточная карцинома и веретинноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходно-клеточная карцинома; папиллярная переходно-клеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома, злокачественная; холангиокарцинома; гепатоцеллюлярная карцинома; комбинация гепатоцеллюлярной карциномы и холангиокарциномы; трабекулярная аденокарцинома; лимфоидная кистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозных полипах; аденокарцинома, семейный колиполипоз; солидная карцинома; карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиоло-альвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; аденокарцинома прозрачных клеток; зернистоклеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулирующая склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; карцинома эндометрия; карцинома придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидно-клеточная карцинома; инфильтрирующаяся протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Паджета, молочные железы; ацинозно-клеточная карцинома; железисто-плоскоклеточная карцинома; аденокарцинома/плоскоклеточная метаплазия; тимома, злокачественная; опухоль стромы яичников, злокачественная; текома, злокачественная; фолликулома, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома клеток Сертоли; опухоль клеток Лейдига, злокачественная; опухоль липидных клеток, злокачественная; параганглиома, злокачественная; параганглиома вне молочной железы, злокачественная; феохромоцитом; гломангиосаркома; злокачественная меланома; беспигментная меланома; поверхностно распространяющаяся меланома; злокачественная меланома в гигантском пигментированном невусе; меланома эпителиоидных клеток; голубой синий невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитома, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; мюллерова смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхиома, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филлоидная опухоль, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дистермиома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; тератома щитовидки, злокачественная; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитом, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимома; астроцитом; протоплазматическая астроцитом; фибриллярная астроцитом; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодентробластома; примитивная нейроэктодермальная; мозжечковая саркома; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; нейрогенная опухоль органов обоняния; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; невринома, злокачественная; зернисто-клеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина;

парагранулома; злокачественная лимфома, мелкоклеточная лимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидный микоз; другие специфические неходжкинские лимфомы; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативное заболевание тонкой кишки; лейкемия; лимфолейкоз; плазмноклеточный лейкоз; эритролейкоз; лимфосаркома клеточная лейкемия; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; и волосатоклеточный лейкоз.

Аутоиммунные заболевания, для которых данные способы лечения являются полезными, включают в себя, без ограничения, системную красную волчанку, спондилоартропатию, анкилозирующий спондилит, псориаз, реактивный артрит, энтеропатический артрит, сахарный диабет, целиакию, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, аутоиммунное заболевание печени, болезнь Аддисона, отторжение трансплантата, болезнь трансплантат против хозяина, болезнь хозяина против трансплантата, язвенный колит, болезнь Крона, болезнь раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, семейную средиземноморскую лихорадку, боковой амиотрофический склероз, синдром Шегрена, ранний артрит, вирусный артрит, рассеянный склероз или псориаз. Диагностика и лечение данных заболеваний хорошо задокументированы в литературе.

Инфекционные заболевания, для которых полезны данные способы лечения, включают в себя, без ограничения, бактериальные инфекции, вирусные инфекции, грибковые инфекции и паразитарные инфекции. Иллюстративные вирусные инфекции включают в себя инфекции вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, вирусом иммунодефицита человека 1, вирусом иммунодефицита человека 2, вирусом папилломы человека, вирусом простого герпеса 1, вирусом простого герпеса 2, опоясывающим лишаем, ветряной оспой, вирусом Коксаки А16, цитомегаловирусом, вирусом эбола, энтеровирусом, вирусом Эпштейна-Барр, хантавирусом, хендравирусом, вирусным менингитом, респираторно-синцитиальным вирусом, ротавирусом, вирусом западного Нила, аденовирусом и вирусом гриппа. Иллюстративные бактериальные инфекции включают в себя инфекции *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, видами *Mycobacteria* (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (группа А стрептококков), *Streptococcus agalactiae* (группа В стрептококков), *Streptococcus* (группа "viridans"), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, патогенными видами *Campylobacter*, видами *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, видами *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, видами *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Actinomyces israelii*, видами шигелл (например, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*), и видами сальмонелл. Иллюстративные грибковые инфекции включают в себя инфекции *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* и *Chlamydia trachomatis*.

Олигонуклеотид-липидный комплекс может быть использован в данном документе в качестве противоопухолевого, противовирусного, антибактериального, противогрибкового, противопаразитарного или антиаутоиммунного агента в различных формах. В конкретном варианте осуществления изобретение предусматривает способы использования комплекса олигонуклеотид-липид, включающие в себя приведение в контакт популяции больных клеток с терапевтически эффективным количеством комплекса олигонуклеотид-липид в течение периода времени, достаточного для ингибирования или обращения вспять заболевания.

В одном варианте осуществления приведение в контакт *in vivo* осуществляют путем введения пациенту внутривенной, внутривентрикулярной, подкожной или внутритуморозной инъекции терапевтически эффективного количества физиологически переносимой композиции, содержащей комплекс олигонуклеотид-липид согласно данному изобретению. Олигонуклеотид-липидный комплекс можно вводить парентерально инъекцией или постепенной инфузией в течение некоторого времени.

Терапевтические композиции, содержащие олигонуклеотид-липидный комплекс, обычно вводят внутривенно или подкожно, например, путем инъекции единицы дозы. Термин "единица дозы" при использовании в отношении терапевтической композиции относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым разбавителем, т.е. переносчиком или носителем.

Композиции вводят способом, совместимым с лекарственной готовой формой, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, которое следует вводить, зависит от подлежащего лечению субъекта, способности системы субъекта использовать активный ингредиент, и желаемой степени терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от суждения практикующего врача и являются индивидуальными для каждого человека. Однако подходящие

диапазоны доз для системного применения раскрыты в данном документе и зависят от пути введения. Также рассматриваются подходящие режимы для начального и бустерного введения и иллюстрируются первичным введением с последующими повторами доз с интервалом в один или большее количество часов с последующей инъекцией или другим введением. Иллюстративные множественные введения описаны в данном документе и являются особенно предпочтительными для поддержания непрерывно высоких уровней полипептида в сыворотке и ткани. В альтернативном варианте рассматривается непрерывная внутривенная инфузия, достаточная для поддержания концентраций в крови в диапазонах, указанных для терапии *in vivo*.

Предполагается, что олигонуклеотид согласно изобретению может быть введен системно или локально для лечения заболевания, такого как ингибирование роста опухолевых клеток, или для уничтожения раковых клеток у раковых пациентов с локальным поздних стадий развития или метастатическим видами рака. Они могут быть введены внутривенно, интратекально, подкожно и/или внутрибрюшинно. Они могут быть введены отдельно или в комбинации с антипролиферативными препаратами. В одном варианте осуществления их вводят для снижения раковой нагрузки у пациента до операции или других процедур. В альтернативном варианте они могут быть введены после операции, чтобы гарантировать, что любой остающийся рак (например, рак, который не удалось устранить хирургическим вмешательством) не выживет.

Терапевтически эффективное количество олигонуклеотида представляет собой заранее определенное количество, рассчитанное для достижения желаемого эффекта, т.е. для ингибирования экспрессии белка-мишени. Таким образом, диапазоны доз для введения олигонуклеотидов согласно данному изобретению достаточно велики для достижения желаемого эффекта. Доза не должна быть настолько большой, чтобы вызвать побочные эффекты, такие как синдромы повышенной вязкости, отек легких, застойная сердечная недостаточность, неврологические эффекты и т.п. В целом, как правило, доза будет варьироваться в зависимости от возраста, состояния, пола и степени заболевания у пациента и может быть определена специалистом в данной области техники. Доза может быть скорректирована лечащим врачом в случае каких-либо осложнений.

Композицию согласно данному изобретению предпочтительно вводят пациенту парентерально, например внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, внутримышечной, внутримышечной, внутримышечной, подкожной, внутримышечной или интратекальной инъекцией, или может быть использована *ex vivo*. Предпочтительные дозы составляют от 5 до 25 мг/кг. Введение предпочтительно повторяют по расписанию, пока рак не исчезнет или не регрессирует, и может сочетаться с другими формами терапии.

Фармацевтические препараты.

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

В тех случаях, когда осуществляют клиническое применение незаряженного липидного компонента (например, в форме липосомы), содержащего олигонуклеотид, в целом, как правило, полезно получить липидный комплекс в виде фармацевтической композиции, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, это повлечет за собой приготовление фармацевтической композиции, которая по существу не содержит пирогенов, а также любых других примесей, которые могут быть вредными для людей или животных. Можно также использовать соответствующие буферы для придания комплексу стабильности и обеспечения возможности поглощения клетками-мишенями.

Фразы "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают неблагоприятную, аллергическую или другую побочную реакцию при введении животному, такому как человек, в зависимости от ситуации. Приготовление 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 раскрытия изобретения, примером которого является Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005, включен в данный документ посредством ссылки. Кроме того, для введения животному (например, человеку), следует понимать, что препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление биологических стандартов FDA.

Как применяется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя 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 лекарственных средств, гели, связующие вещества, наполнители, дезинтегрирующие агенты, смазывающие вещества, подсластители, ароматизаторы, красители, такие подобные материалы и их комбинации, как известно специалисту в данной области техники. Фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно готовят для введения человеку, хотя в некоторых вариантах осуществления может быть желательно использовать фармацевтически приемлемый носитель, который готовят для введения отличному от человека животному, но который не будет приемлемым (например, из-за государственного регулирования) для введения человеку. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель несовмес-

тим с активным ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических или фармацевтических композициях.

Фактическое количество дозы композиции согласно данному изобретению, вводимой пациенту или субъекту, может определяться физическими и физиологическими факторами, такими как масса тела, тяжесть патологии, тип заболевания, которое лечат, предыдущие или сопутствующие терапевтические вмешательства, особенности пациента, и путь введения. В любом случае практикующий врач, ответственный за введение, будет определять концентрацию активного ингредиента(ов) в композиции и соответствующую дозу(ы) для отдельного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут содержать, например, по меньшей мере примерно 0,1% активного соединения. В других вариантах осуществления активное соединение может составлять, например, от около 2 до около 75% от массы единицы дозы или, например, от около 25 до около 60% и любой диапазон, получаемый из них. В других неограничивающих примерах, доза также может составлять от около 1 мкг/кг/массы тела, около 5 мкг/кг/массы тела, около 10 мкг/кг/массы тела, около 50 мкг/кг/массы тела, около 100 мкг/кг/массы тела, около 200 мкг/кг/массы тела, около 350 мкг/кг/массы тела, около 500 мкг/кг/массы тела, около 1 мг/кг/массы тела, около 5 мг/кг/массы тела, около 10 мг/кг/массы тела, около 50 мг/кг/массы тела, около 100 мг/кг/массы тела, около 200 мг/кг/массы тела, около 350 мг/кг/массы тела, около 500 мг/кг/массы тела до около 1000 мг/кг/массы тела или большее за одно введение и любой диапазон, получаемый из них. В неограничивающих примерах получаемого диапазона из чисел, перечисленных в данном документе, может быть введен диапазон от около 5 мкг/кг/массы тела до около 1000 мг/кг/массы тела, от около 5 мкг/кг/массы тела до около 500 мг/кг/массы тела и т.д.

Олигонуклеотид согласно данным вариантам осуществления можно вводить в дозе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80 90, 100 мкг или более нуклеиновой кислоты в дозе. Каждая доза может иметь объем 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 или большее количество 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. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Терапевтические композиции согласно данному изобретению преимущественно вводят в форме инъеклируемых композиций в виде жидких растворов или суспензий; также могут быть приготовлены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Эти препараты также могут быть эмульгированы. Типичная композиция для этой цели содержит фармацевтически приемлемый носитель. Например, композиция может содержать 10, 25, 50 или вплоть до 100 мг человеческого сывороточного альбумина на 1 мл забуференного фосфатом солевого раствора. Другие фармацевтически приемлемые носители включают в себя водные растворы, нетоксичные наполнители, в том числе соли, консерванты, буферы и т.п.

Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительное масло и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают в себя воду, спиртовые/водные растворы, солевые растворы, парентеральные носители, такие как хлорид натрия, декстроза Рингера и т.д. Внутривенные носители включают в себя восполнители жидкости и питательных веществ. Консерванты включают в себя антимикробные агенты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и инертные газы. pH и точную концентрацию различных компонентов фармацевтической композиции регулируют в соответствии с хорошо известными параметрами.

Терапевтические композиции согласно данному изобретению могут содержать классические фармацевтические препараты. Введение терапевтических композиций согласно данному изобретению будет осуществляться любым общепринятым путем, если ткань-мишень доступна через этот путь. Это включает в себя оральный, назальный, буккальный, ректальный, вагинальный или местный. Местное введение может быть особенно полезным для лечения рака кожи, для предотвращения алопеции, вызванной химиотерапией, или другого кожного гиперпролиферативного нарушения. В альтернативном варианте, введение может быть ортотопической, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутривенной инъекцией. Такие композиции обычно вводят в виде фармацевтически приемлемых композиций, которые содержат физиологически приемлемые носители, буферы или другие наполнители. Для лечения патологий легких может использоваться аэрозольная доставка. Объем аэрозоля составляет от около 0,01 до 0,5 мл.

Эффективное количество терапевтической композиции определяется исходя из намеченной цели. Термин "единица дозы" или "доза" относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения субъектом, причем каждая единица содержит заранее определенное количество терапевтической композиции, рассчитанное для получения желаемых реакций, обсуждаемых выше, в связи с ее введением, т.е. соответствующим путем и по схеме лечения. Количество, которое должно быть введено как в зависимости от количества обработок, так и единицы дозы, зависит от желаемой защиты или эффекта.

Точные количества терапевтической композиции также зависят от суждения практикующего врача

и являются индивидуальными для каждого человека. Факторы, влияющие на дозу, включают в себя физическое и клиническое состояние пациента, путь введения, предполагаемую цель лечения (например, облегчение симптомов по сравнению с излечением) и эффективность, стабильность и токсичность конкретного терапевтического вещества.

Комбинированное лечение.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно данному изобретению включают в себя ингибирующий олигонуклеотид или олигонуклеотид, способный экспрессировать ингибитор экспрессии гена, в комбинации со второй или дополнительной терапией. Способы и композиции, включая комбинированную терапию, усиливают терапевтический или защитный эффект и/или усиливают терапевтический эффект другой противораковой или антипролиферативной терапии. Терапевтические и профилактические способы и композиции могут быть предложены в комбинированном количестве, эффективном для достижения желаемого эффекта, такого как уничтожение раковой клетки и/или ингибирование клеточной гиперпролиферации. Этот процесс может включать в себя приведение в контакт клеток с ингибитором экспрессии генов и второй терапией. Ткань, опухоль или клетка могут быть приведены в контакт с одной или большим количеством композиций или фармакологических готовых форм, содержащих один или большее количество агентов (т.е. ингибитор экспрессии гена или противораковый агент), или путем приведения в контакт ткани, опухоли и/или клетки с двумя или большим количеством различных композиций или готовых форм, причем одна композиция обеспечивает:

- 1) ингибирующий олигонуклеотид;
- 2) противораковый агент или
- 3) как ингибирующий олигонуклеотид, так и противораковый агент.

Также предполагается, что такая комбинированная терапия может использоваться в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, хирургической терапией или иммунотерапией.

Ингибирующий олигонуклеотид можно вводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно противоракового лечения. Введения могут осуществляться с интервалами от одновременно до нескольких минут, до нескольких дней, до нескольких недель. В вариантах осуществления, в которых ингибирующий олигонуклеотид предоставляют пациенту отдельно от противоракового агента, обычно гарантируется, что не будет значительного разрыва времени между временем каждой доставки, так что эти два соединения все еще будут способны оказывать выгодный комбинированный эффект на пациента. В таких случаях предполагается, что можно обеспечить пациента ингибирующей олигонуклеотидной терапией и противораковой терапией в пределах примерно от 12 до 24 или 72 ч друг от друга и более предпочтительно в течение примерно 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может быть желательным значительно увеличить период лечения, при этом между соответствующими введениями есть промежуток 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 осуществления 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 больше. Предполагается, что один агент может быть введен в 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 другой агент вводят в 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 назначен один или большее количество приемов агента(ов). Кроме того, после курса лечения предполагается, что существует период времени, в течение которого не проводится противораковое лечение. Этот период времени 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 и больше, в зависимости от состояния пациента, такого как его прогноз, выносливость, здоровье и т.д.

Могут быть использованы различные комбинации. Для приведенного ниже примера ингибирующая олигонуклеотидная терапия представляет собой "А", а противораковая терапия или аутоиммунная терапия - "В":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B
B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A
B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A
A/A/B/A

Введение любого соединения или терапии согласно данному изобретению пациенту будет происходить согласно общим протоколам введения таких соединений, принимая во внимание токсичность агентов, если таковая имеется. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления существует этап мониторинга токсичности, которая свойственна комбинированной терапии. Ожидается, что циклы лечения

протонное облучение (патенты США № 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Скорее всего, все эти факторы вызывают широкий спектр повреждений ДНК, воздействуют на предшественников ДНК, репликацию и репарацию ДНК, а также на сборку и поддержание хромосом. Диапазон доз для рентгеновского излучения варьирует от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение продолжительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз для радиоизотопов варьируют в широких пределах и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также от поглощения опухолевыми клетками.

Термины "приводили в контакт" и "подвергали воздействию" применительно к клетке используются в данном документе для описания процесса, посредством которого терапевтическая конструкция и химиотерапевтический или радиотерапевтический агент доставляются в клетку-мишень или помещаются прямо возле клетки-мишени. Например, для достижения уничтожения клеток оба агента доставляются в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

Иммунотерапия.

В контексте лечения рака иммунотерапевтические препараты, в целом, как правило, основаны на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания на и уничтожения раковых клеток. Трастузумаб (Герцептин™) является таким примером. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное к какому-либо маркеру на поверхности опухолевой клетки. Одно антитело может служить эффектором терапии или может привлекать другие клетки для фактического вызова уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим агентом, радионуклидом, цепью А рицина, токсином холеры, токсином коклюша и т. д.) и служит просто в качестве нацеливающего агента. В альтернативном варианте эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или косвенно взаимодействует с мишенью-опухолевой клеткой. Различные эффекторные клетки включают в себя цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки. Комбинация терапевтических методов, то есть прямой цитотоксической активности и ингибирования или уменьшения ErbB2, обеспечит терапевтическую пользу при лечении рака со сверхэкспрессией ErbB2.

Другая иммунотерапия также может быть использована как часть комбинированной терапии с генотерапией, обсуждаемой выше. В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна иметь некоторый маркер, который поддается нацеливанию, т.е. не присутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте данного изобретения. Распространенные опухолевые маркеры включают в себя карциноэмбриональный антиген, специфический антиген простаты, антиген, ассоциированный с опухолью мочевого пузыря, фетальный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, антиген Сиалила Льюиса, MusA, MusB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, erbB и c155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противоопухолевых эффектов с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включающие в себя цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12, GM-CSF, гамма-ИФН, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, ИЛ-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3. Было показано, что комбинирование иммуностимулирующих молекул либо в виде белков, либо с использованием доставки генов, в комбинации с опухолевым супрессором усиливает противоопухолевые эффекты. Кроме того, антитела против любого из этих соединений могут быть использованы для нацеливания противораковых агентов, обсуждаемых в данном документе.

Примерами иммунотерапии, которые в настоящее время исследуются или используются, являются иммунные адъюванты, например *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США № 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), терапия цитокинами, например интерферонами α , β и γ ; генная терапия ИЛ-1, GM-CSF и ФНО (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998), например, ФНО, ИЛ-1, ИЛ-2, p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США № 5830880 и 5846945) и моноклональные антитела, например антиангиоген GM2, анти-HER-2, анти-p185 (Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; патент США № 5824311). Предполагается, что одна или большее количество противораковых терапий могут быть использованы с описанными в данном документе терапиями сайленсинга генов.

При активной иммунотерапии антигенный пептид, полипептид или белок, или композицию, или "вакцину" аутологических или аллогенных опухолевых клеток вводят, как правило, с отдельным бактериальным адъювантом (Ravindranath and Morton, 1991; Morton et al., 1992; Mitchell et al., 1990; Mitchell et al., 1993).

При адаптивной иммунотерапии циркулирующие лимфоциты пациента или инфильтрированные в опухоль лимфоциты выделяют *in vitro*, активируют лимфокинами, такими как ИЛ-2, или трансдуцируют генами некроза опухоли и вводят назад (Rosenberg et al., 1988; 1989).

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия может представлять собой ингибитор контрольной точки иммунитета. Контрольные точки иммунитета либо увеличивают сигнал (например, костимулирующие молекулы), либо уменьшают сигнал. Ингибирующие контрольные точки иммунитета,

которые могут быть мишенью блокады контрольной точки иммунитета, включают в себя аденозиновый рецептор A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), также известный как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммуноглобулин клеток-киллеров (KIR), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), белок запрограммированной смерти 1 (PD-1), иммуноглобулиновый домен и муциновый домен 3 (TIM-3) Т-лимфоцитов и V-домен Ig - супрессор активации Т-лимфоцитов (VISTA). В частности, ингибиторы контрольной точки иммунитета нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

Ингибиторы контрольной точки иммунитета могут представлять собой лекарственные агенты, такие как малые молекулы, рекомбинантные формы лиганда или рецепторов, или, в частности, антитела, такие как антитела человека (например, международная публикация патента № WO2015016718; Pardoll, Nat. Rev. Cancer, 12(4):252-64, 2012; оба включены в данный документ посредством ссылки). Могут быть использованы известные ингибиторы белков контрольной точки иммунитета, или их аналоги, в частности, могут использоваться химерные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалисту, для определенных антител, упомянутых в данном раскрытии изобретения, могут использоваться альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные имена являются взаимозаменяемыми в контексте данного раскрытия изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями MK-3475 и пембролизумаб.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с его лигандами-партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию лиганда PD-1 являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления, антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером по связыванию PDL2 является PD-1. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид. Иллюстративные антитела описаны в патентах США № 8735553, 8354509 и 8008449, все они включены в данный документ посредством ссылки. В данной области техники известны другие антагонисты оси PD-1 для использования в способах, представленных в данном документе, такие как описанные в публикациях патентов США № 20140294898, 2014022021 и 20110008369, все включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую часть PDL1 или PDL2, слитую с константной областью (например, область Fc последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления антагонистом связывания PD-1 является AMP-224. Ниволумаб, также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO", представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2006/121168. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/114335. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/101611. AMP-224, также известный как B7-DCIg, является гибридным PDL2-Fc растворимым рецептором, описанным в WO 2010/027827 и WO 2011/066342.

Другая контрольная точка иммунитета, которая может быть мишенью в способах, представленных в данном документе, представляет собой белок 4, ассоциированный с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA-4), также известный как CD152. Полная кДНК последовательность CTLA-4 человека имеет номер доступа L15006 ГенБанка. CTLA-4 обнаружен на поверхности Т-лимфоцитов и действует как выключатель, когда он связан с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, которое экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов-хелперов и передает ингибирующий сигнал Т-лимфоцитам. CTLA4 похож на костимулирующий белок Т-лимфоцитов, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемые B7-1 и B7-2 соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает ингибирующий сигнал Т-лимфоцитам, тогда как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также обнаружен в регуляторных Т-лимфоцитах и может быть важен для их функции. Активация Т-лимфоцитов через рецептор Т-лимфоцитов и CD28 приводит к повышенной экспрессии CTLA-4, ингибиторного рецептора для молекул B7.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки иммунитета представляет собой анти-CTLA-4 антитело (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело), его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, гибридный белок или олигопептид.

Антитела против CTLA-4 человека (или полученные из них домены VH и/или VL), подходящие для

использования в данных способах, могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. В качестве альтернативы могут быть использованы анти-CTLA-4 антитела, признанные в данной области техники. Например, в способах, раскрытых в данном документе, могут быть использованы анти-CTLA-4 антитела, раскрытые в патенте США № 8119129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP 675206, также известный как тремелимумаб; ранее тицилимумаб), патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004), J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998), Cancer Res. 58:5301-5304. Методы каждой из вышеупомянутых публикаций тем самым включены посредством ссылки. Также могут быть использованы антитела, которые конкурируют с любым из этих известных в данной области техники антител за связывание с CTLA-4. Например, гуманизированное антитело к CTLA-4 описано в международной заявке на патент № WO 01/014424, WO 00/037504 и патенте США № 8017114; все включены в данный документ посредством ссылки.

Иллюстративным анти-CTLA-4 антителом является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Yervoy®) или его антигенсвязывающие фрагменты и их варианты (см., например, WO 01/14424). В других вариантах осуществления антитело содержит CDR или VR тяжелой и легкой цепей ипилимумаба. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VH ипилимумаба, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VL ипилимумаба. В другом варианте осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеуказанные антитела. В другом варианте осуществления антитело обладает по меньшей мере около 90% идентичности аминокислотной последовательности вариационной области с вышеуказанными антителами (например, по меньшей мере около 90, 95 или 99% идентичности вариационной области с ипилимумабом).

Другие молекулы для модуляции CTLA-4 включают в себя лиганды и рецепторы CTLA-4, такие как описанные в патентах США № 5844905, 5885796 и международных заявках на патент № WO 95/01994 и WO 98/42752; все включены в данный документ посредством ссылки, и иммуноадгезины, такие как описанные в патенте США № 8329867, включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия может быть адаптивной иммунотерапией, которая включает в себя перенос аутологичных антигенспецифических Т-лимфоцитов, получаемых *ex vivo*. Т-лимфоциты, используемые для адаптивной иммунотерапии, могут быть получены либо путем экспансии антигенспецифических Т-лимфоцитов, либо путем перенацеливания Т-лимфоцитов с помощью генной инженерии (Park, Rosenberg et al., 2011). Выделение и перенос опухолевоспецифических Т-лимфоцитов оказались успешными при лечении меланомы. Новые специфичности в Т-лимфоцитах были успешно получены посредством генетического переноса трансгенных рецепторов Т-лимфоцитов или химерных антигенных рецепторов (ХАР) (Jena, Dotti et al., 2010). ХАР представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из нацеливающего фрагмента, который соединен с одним или большим количеством сигнальных доменов в одной гибридной молекуле. В целом, связывающий фрагмент ХАР состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), содержащего легкий и вариационный фрагменты моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Также успешно применялись связывающие фрагменты, основанные на рецепторных или лигандных доменах.

Сигнальные домены для ХАР первого поколения получают из цитоплазматической области CD3-зета или цепей гамма рецептора Fc. ХАР успешно позволили перенацеливать Т-лимфоциты на антигены, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток из различных злокачественных новообразований, включая лимфомы и солидные опухоли (Jena, Dotti et al., 2010).

В одном варианте осуществления согласно данному изобретению предлагается комбинированная терапия для лечения рака, причем комбинированная терапия включает в себя адаптивную терапию Т-лимфоцитами и ингибитором контрольной точки. В одном аспекте адаптивная терапия Т-лимфоцитами включает в себя аутологичные и/или аллогенные Т-лимфоциты. В другом аспекте аутологичные и/или аллогенные Т-лимфоциты нацелены на опухолевые антигены.

Хирургия.

Примерно 60% больных раком будут подвергаться хирургическому вмешательству определенного типа, которое включает в себя профилактические, диагностические или для определения стадии, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия - это лечение рака, которое может использоваться в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение согласно данному изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения.

Лечебная хирургия включает в себя резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или разрушается. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли, лечение хирургическим путем включает в себя лазерную хирургию, криохимию, электрохимию и микроскопически контролируемую хирургию (хирургия по Моху). Кроме того, предполагается, что данное изобретение может быть использовано в комбинации с удалением поверхностных раков, предраковых патологий или несвойственных количеств нормальной ткани.

При удалении части или всех раковых клеток, ткани или опухоли в теле может образоваться полость. Лечение может быть выполнено перфузией, прямой инъекцией или местным применением к области с дополнительной противораковой терапией. 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. Дозы этих способов лечения также могут быть изменены.

Другие агенты.

Предполагается, что другие агенты могут быть использованы в комбинации с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления для улучшения терапевтической эффективности лечения. Эти дополнительные агенты включают в себя агенты, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и щелевые контакты, цитостатические и дифференцирующие агенты, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к апоптотическим индукторам, или другие биологические агенты. Увеличение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения числа щелевых контактов усилит анти-гиперпролиферативные эффекты на соседнюю популяцию гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления цитостатические или дифференцирующие агенты могут использоваться в комбинации с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления для улучшения анти-гиперпролиферативной активности средств лечения. Предполагается, что ингибиторы клеточной адгезии улучшают эффективность данных вариантов осуществления. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (КФА) и ловастатин. Дополнительно, предполагается, что другие агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело c225, могут быть использованы в комбинации с некоторыми аспектами данных вариантов осуществления для улучшения эффективности лечения.

Наборы и диагностика.

В различных аспектах изобретения предусмотрен набор, содержащий терапевтические агенты, и/или другие терапевтические агенты и агенты доставки. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предусматривает набор для приготовления и/или введения терапии согласно изобретению. Набор может содержать реагенты, которые могут быть использованы для введения активного или эффективного агента(ов) согласно данному изобретению. Реагенты из набора могут включать в себя по меньшей мере один ингибитор экспрессии генов (например, олигонуклеотиды STAT3), один или большее количество липидных компонентов, один или большее количество противораковых компонентов комбинированной терапии, а также реагенты для подготовки, приготовления и/или введения компонентов согласно данному изобретению, или выполняют один или большее количество этапов способов изобретения.

В некоторых вариантах осуществления набор также может содержать подходящее контейнерное средство, которое представляет собой контейнер, который не будет реагировать с компонентами набора, например пробирку эппендорф, аналитическую плашку, шприц, флакон или пробирку. Контейнер может быть изготовлен из стерилизуемых материалов, таких как пластик или стекло.

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

Примеры

Следующие примеры включены для демонстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в следующих примерах, представляют методы, открытые изобретателем для эффективного использования при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться как составляющие предпочтительные способы его применения. Однако специалистам в данной области техники в свете данного раскрытия изобретения должно быть понятно, что в конкретных вариантах осуществления, которые раскрыты, могут быть сделаны многочисленные изменения, и все же будет полученный похожий или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения.

Пример 1. STAT3-нацеленные Р-этоксид олигонуклеотиды.

Олигонуклеотиды, нацеленные на STAT3, были разработаны для использования в липосомном STAT3 антисмысловом лекарственном продукте для ингибирования экспрессии STAT3. Непрерывная последовательность кДНК STAT3 представлена в SEQ ID NO: 5, а последовательность белка STAT3 представлена в SEQ ID NO: 6. Последовательность каждого из олигонуклеотидов представлена в табл. 4.

Таблица 4

STAT3 антисмысловые последовательности	
SEQ ID NO:	Последовательность
1	5'-CAA AGT GGC ATG TGA TTC -3'
2	5'-GCT ATA CTG CTG GTC AAT -3'
3	5'-CTT CGT AGA TTG TGC TGA -3'
4	5'-CTG ATA ATT CAA CTC AGG -3'

Липосомальный STAT3 антисмысловый лекарственный продукт изготавливали в соответствии со способами, описанными в данном документе. Масс-спектрометрический анализ показал, что около 80% олигонуклеотидного лекарственного вещества имеют от трех до семи фосфодиэфирных связей остова. Анализ частиц показал, что 90% липосом имели диаметр частиц 2319 нм или меньше, 50% липосом имели диаметр частиц 368 нм или меньше, и около 18% липосом имели диаметр частиц 300 нм или меньше.

Пример 2. Ингибирование экспрессии STAT3 с помощью Р-этоксид олигонуклеотидов.

Способность липосомного антисмыслового STAT3 агента ингибировать экспрессию STAT3 была проверена на двух клеточных линиях аденокарциномы легкого, H1975 и HCC 827. Липосомальный STAT3 антисмысловый агент, соответствующий SEQ ID NO: 4 (180 мкг/мл), или эквивалентное количество пустых липосом инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней. Согласно данным на фиг. 1 продемонстрировано, что инкубация с липосомным STAT3 антисмысловым агентом, но не с пустыми липосомами снижает уровень экспрессии STAT3 относительно β -актина.

Пример 3. Ингибирование жизнеспособности раковых клеток липосомным STAT3 антисмысловым агентом.

Способность липосомного STAT3 антисмыслового агента ингибировать жизнеспособность клеток немелкоклеточного рака легких была протестирована на трех клеточных линиях аденокарциномы легких: H1975, HCC 827 и H358. Липосомальный антисмысловый STAT3 агент, соответствующий одной из SEQ ID NO: 1-4, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней. Согласно данным на фиг. 2A-2C продемонстрировано, что инкубация с липосомным STAT3 антисмысловым агентом снижает жизнеспособность клеток каждой клеточной линии, причем наиболее эффективным является липосомный STAT3 антисмысловый агент, соответствующий SEQ ID NO: 4.

Способность липосомного STAT3 антисмыслового агента ингибировать рост лейкозных клеток была проанализирована на трех линиях лейкозных клеток человека: K-562, MV4-11 и Kasumi-1. Липосомный STAT3 антисмысловый агент, соответствующий SEQ ID NO: 4, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней. Согласно данным на фиг. 3A продемонстрировано, что инкубация с липосомным STAT3 антисмысловым агентом снижает жизнеспособность клеток каждой клеточной линии.

Способность липосомного STAT3 антисмыслового агента ингибировать рост клеток лимфомы тестировали на пяти клеточных линиях лимфомы человека: DOHH-2, SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-10 и RL. Липосомный STAT3 антисмысловый агент, соответствующий SEQ ID NO: 4, инкубировали с каждой клеточной линией в течение четырех дней. Согласно данным на фиг. 3B продемонстрировано, что инкубация с липосомным STAT3 антисмысловым агентом снижает жизнеспособность клеток каждой клеточной линии.

Все способы, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть осуществлены и выполнены без излишнего экспериментирования в свете данного раскрытия изобретения. Хотя композиции и способы согласно данному изобретению были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники должно быть очевидно, что к способам и на этапах или в последовательности этапов способа, описанного в данном документе, могут применяться изменения, не отступая от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут заменить агенты, описанные в данном документе, и в то же время будут получены такие же или аналогичные результаты. Предполагается, что все подобные аналогичные заменители и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Список использованных источников

Следующие источники в той мере, в которой они предоставляют иллюстративные процедурные или иные подробности, дополняющие изложенные в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Патент США № 4659774.

Патент США № 4816571.

Патент США № 4870287.

Патент США № 4959463.

Патент США № 5141813.

Патент США № 5214136.

Патент США № 5223618.
Патент США № 5264566.
Патент США № 5378825.
Патент США № 5428148.
Патент США № 5446137.
Патент США № 5466786.
Патент США № 5470967.
Патент США № 5539082.
Патент США № 5554744.
Патент США № 5574146.
Патент США № 5602240.
Патент США № 5602244.
Патент США № 5610289.
Патент США № 5614617.
Патент США № 5623070.
Патент США № 5652099.
Патент США № 5670663.
Патент США № 5672697.
Патент США № 5681947.
Патент США № 5700922.
Патент США № 5705629.
Патент США № 5708154.
Патент США № 5714331.
Патент США № 5714606.
Патент США № 5719262.
Патент США № 5736336.
Патент США № 5739169.
Патент США № 5760395.
Патент США № 5763167.
Патент США № 5766855.
Патент США № 5773571.
Патент США № 5777092.
Патент США № 5786461.
Патент США № 5792847.
Патент США № 5801005.
Патент США № 5824311.
Патент США № 5830880.
Патент США № 5846945.
Патент США № 5855911.
Патент США № 5858988.
Патент США № 5859221.
Патент США № 5872232.
Патент США № 5886165.
Патент США № 5891625.
Патент США № 5908845.
Патент США № 9744187.

- Amin et al., *Oncogene*, 22:5399–5407, 2013.
- Austin–Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838–845, 1998.
- Bailey and Sullivan, *Biochimica. Biophys. Acts.*, 239–252, 2000.
- Bangham et al., *J. Mol. Biol.*, 13(1):253–259, 1965.
- Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337–2347, 1998.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027–3037, 1998.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389–398, 1998.
- Deamer and Uster, In: *Liposome Preparation: Methods and Mechanisms*, Ostro (Ed.), *Liposomes*, 1983.
- Dokka et al., *Pharm Res*, 17: 521–25, 2000.
- duBois et al., *J Clin Oncol*, 17: 46–51, 1999.
- Dubey et al, *J. Drug Target*, 12:257–264, 2004.
- Duxbury et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311:786–792, 2003.
- Duxbury et al., *Oncogene*, 23:1448–1456, 2004.
- Egholm et al., *Nature*, 365(6446):566–568, 1993.
- Elbashir et al., *Nature*, 411 (6836):494–498, 2001.
- Эвропейская заявка 01219
- Эвропейская заявка 266032
- Fagard et al., *JAKSTAT*, 2:e22882, 2013.
- Farhood et al., *Biochim. Biophys. Act*, 289–295, 1995.
- Fire et al., *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- Flenniken et al., *Dev. Biol.*, 179:382–401, 1996.
- Froehler et al., *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399–5407, 1986.
- Gabizon, *Cancer Invest.*, 19:424–436, 2001.
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87–104, 1991.
- Gregoriadis, In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, Gregoriadis (Ed.), 287–341, 1979.
- Gutierrez–Puente et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291:865–869, 1999.
- Halder et al., *Clinical Cancer Research*, 11: 8829–36, 2005.
- Han et al., *Ann Surg Oncol*, 4:264–268, 1997.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480–485, 1998.

- Hannon and Rossi, *Nature*, 431:371–378, 2004.
- Hardee et al., *G3 (Bethesda)* 3:2173–2185, 2013.
- Hassani et al., *J. Gene Med.*, 7(2):198–207, 2005.
- Hecker et al., *Cancer Research*, 62:2699–2707, 2002.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347–353, 1998.
- Hortobagyi et al., *J. Clin. Oncol.*, 19:3422–3433, 2001.
- Hsia et al., *J Cell Biol*, 160:753–67, 2003.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329–5336, 1998.
- Jackson et al., *Nat. Biotechnol.*, 21:635–637, 2003.
- Jemal et al., *CA Cancer J. Clin.*, 55(1):10–30, 2005.
- Judson et al., *Cancer*, 86: 1551–56, 1999.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375–378, 1989.
- Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361–3364, 1991.
- Kim et al., *Nat. Biotechnol.*, 22:321–325, 2004.
- Kinch et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 20:59–68, 2003.
- Klein et al., *Gastroenterology*, 125:9–18, 2003.
- Kohn et al., *Int J Cancer*, 97:336–43, 2002.
- Kornberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- Kornberg et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:4463–69, 2004.
- Kornberg, *Head Neck*, 20: 634–639, 1998.
- Kostarelos et al., *Int J Cancer*, 112: 713–21, 2004.
- Krasnici et al., *Int. J. Cancer*, 105(4):561–567, 2003.
- Landen, *Cancer Res*, 65: 6910–18, 2005.
- Langley et al., *Cancer Research*, 63: 2971–76, 2003.
- Lewis et al., *Cell*, 115:787–798, 2003.
- Lewis et al., *Nat. Genet.*, 32:107–108, 2002.
- Lori et al., *Am. J. Pharmacogenomics*, 2:245–252, 2002.
- Matsuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:16–22, 2004.
- McCaffrey et al., *Nature*, 418:38–39, 2002.
- McGuire et al., *New England Journal of Medicine*, 334:1–6, 1996.
- McLean et al., *Expert Opin Pharmacother*, 4: 227–34, 2003.
- Miklossy et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12:611–629, 2013.
- Miller et al., *Biochemistry*, 37(37):12875–83, 1998.
- Mitchell et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153–166, 1993.
- Mitchell et al., *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856–869, 1990.
- Mitra et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 56–68, 2005.
- Mitra et al., *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2005.
- Morton et al., *Arch. Surg.*, 127:392–399, 1992.
- Nemoto et al., *Pathobiology*, 65:195–203, 1997.
- Nicolau et al., *Methods Enzymol.*, 149:157–176, 1987.

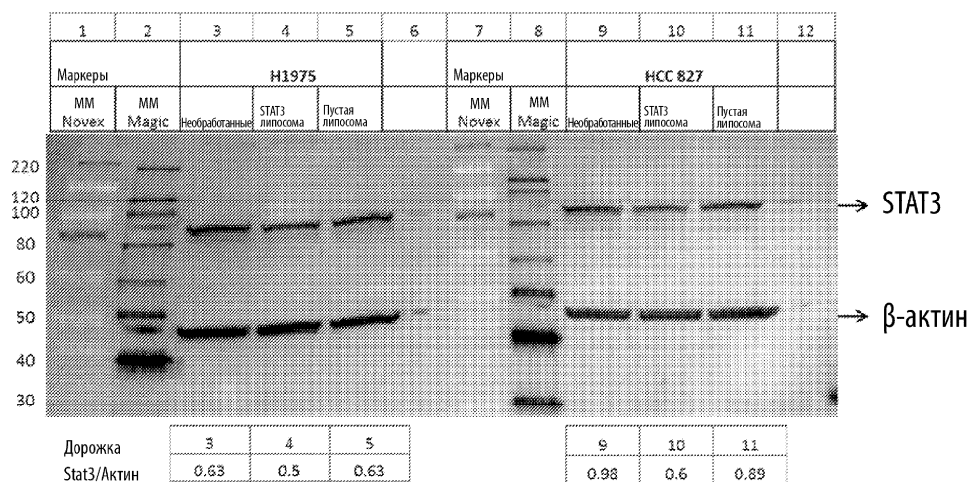
- Noblitt et al., *Cancer Gene Ther.*, 11:757–766, 2004.
- Ogawa et al., *Oncogene*, 19:6043–6052, 2000.
- Owens et al., *Cancer Res*, 55:2752–2755, 1995.
- Park et al., *Cancer Lett.*, 118:153–160, 1997.
- Заявка PCT WO 92/20702
- Заявка PCT WO02/100435A1
- Заявка PCT WO03/015757A1
- Заявка PCT WO04/002453A1
- Заявка PCT WO04029213A2
- Pietras et al., *Oncogene*, 17(17):2235–2249, 1998.
- Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411–14416, 1998.
- Ravindranath and Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303–329, 1991.
- Reich et al., *Mol. Vis.*, 9:210–216, 2003.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289–1329, 1990.
- Rosenberg et al., *Ann. Surg.* 210(4):474–548, 1989.
- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Ryther et al., *Gene Ther.*, 12(1):5–11, 2004.
- Sambrook et al., In: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- Schaller and Parsons, *Trends in Cell Biology*, 3:258–62, 1993.
- Schaller et al., *Mol Biol Cell*, 10:3489–3505, 1999.
- Schaller, *Biochim Biophys Acta*, 1540:1–21, 2001.
- Schaller, *J Endocrinol*, 150:1–7, 1996.
- Schaller, *Trends Cell Biol*, 3:258–262, 1993.
- Scheit, In: *Synthesis and Biological Function*, Wiley–Interscience, NY, 171–172, 1980.
- Schlaepfer and Hunter, *Trends in Cell Biology*, 8: 151–57, 1998.
- Schlaepfer et al., *Prog Biophys Mol Biol*, 71: 435–78, 1999.
- Scuto et al., *Cancer Res.*, 71:3182–3188, 2011.
- Sein et al., *Oncogene*, 19: 5539–42, 2000.
- Sheta et al., *J Natl Cancer inst*, 92: 1065–73, 2000.
- Shibata et al., *Cancer Res*, 58: 900–903, 1998.
- Sieg et al., *Nat Cell Biol*, 2:249–56, 2000.
- Sioud and Sorensen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 312:1220–1225, 2003.
- Siwak et al., *Clin Cancer Res*, 8: 955–56, 2002.
- Sledz et al., *Nat. Cell Biol.*, 5:834–839, 2003.
- Song et al., *Nature Med.* 9:347–351, 2003.
- Sonoda et al., *Journal of Biological Chemistry*, 275:16309–15, 2000.
- Sood et al., *Am J Pathol*, 165:1087–1095, 2004.
- Sood et al., *Cancer Biology & Therapy*, 1: 511–17, 2002.

- Sorensen et al., J. Mol. Biol., 327:761–66, 2003.
- Soutschek et al., Nature, 432:173–178, 2004.
- Spagnou et al., Biochemistry, 43:13348–13356, 2004.
- Sulman et al., Genomics, 40:371–374, 1997.
- Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4194–4198, 1978.
- Thaker et al., 36th Annual Meeting of the Society of Gynecologic Oncologists, Miami, Fla., 2005.
- Thaker et al., Clin. Cancer Res., 10:5145–5150, 2004.
- Thurston et al., J. Clin. Invest., 101(7):1401–1413, 1998.
- Uchida et al., Mol. Ther., 10:162–171, 2004.
- Voskoglou–Nomikos et al., Clin. Cancer Res., 9:4227–4239, 2003.
- Walker–Daniels et al., Prostate, 41:275–80, 1999.
- Wianny et al., Nat. Cell Biol., 2:70–75, 2000.
- Wong et al., Gene, 10:87–94, 1980.
- Wu et al., J. Hematol. Oncol., 4:31, 2011.
- Xia et al., Nat. Biotechnol., 20:1006–10, 2002.
- Yang et al., Oncogene, 22:5694–701, 2003.
- Zelinski et al., Cancer Res., 61:2301, 2001.
- Zhang et al., J. Biol. Chem., 279:10677–684, 2004.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

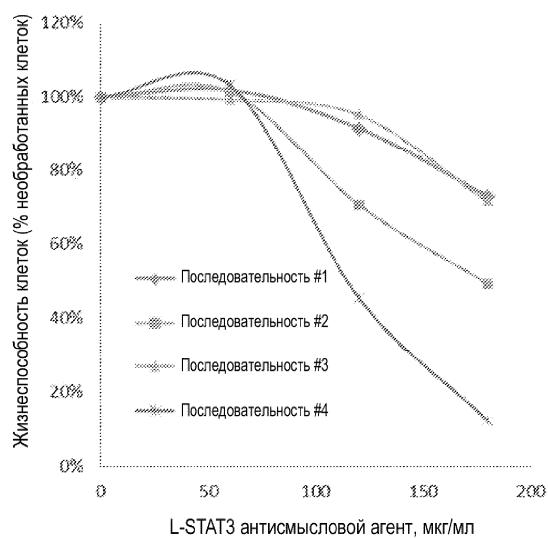
1. Композиция для понижения уровня экспрессии белка STAT3 в клетке, содержащая популяцию олигонуклеотидов, причем олигонуклеотиды гибридизируются с полинуклеотидным продуктом гена STAT3, при этом олигонуклеотиды популяции состоят из нуклеозидных молекул, соединенных друг с другом фосфатными связями остова, причем 60–75% указанных фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидные связи остова, где 25–40% фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой фосфодиэфирные связи остова, где олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1–4 каждый.
2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 1.
3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 2.
4. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 3.
5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции содержат последовательность согласно SEQ ID NO: 4.
6. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что фосфодиэфирные связи остова распределены по всему каждому олигонуклеотиду.
7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что фосфодиэфирные связи остова не сгруппированы в пределах части каждого олигонуклеотида.
8. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов является гетерогенной по количеству Р-этоксидных связей остова и фосфодиэфирных связей остова, имеющихся в олигонуклеотидах популяции.
9. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют размер в пределах от 18 до 30 нуклеотидов.
10. Композиция по п.9, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 18 нуклеотидов, причем не больше чем 14 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова.
11. Композиция по п.9, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 20 нуклеотидов, причем не больше чем 16 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова.
12. Композиция по п.9, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 25 нуклеотидов, причем не больше чем 20 фосфатных связей остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова.
13. Композиция по п.9, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции имеют средний размер 30 нуклеотидов, причем не больше чем 24 фосфатные связи остова в каждом олигонуклеотиде представляют собой Р-этоксидную связь остова.

14. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержит один вид олигонуклеотидов.
15. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержит по меньшей мере два вида олигонуклеотидов.
16. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов является гетерогенной по распределению фосфодиэфирных связей остова среди олигонуклеотидов популяции.
17. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что олигонуклеотиды популяции ингибируют экспрессию белка STAT3.
18. Композиция по п.1, дополнительно содержащая фосфолипиды, 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 pH.
20. Композиция по п.19, отличающаяся тем, что фосфолипиды являются нейтральными фосфолипидами.
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 по существу не содержат холестерина.
24. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что фосфолипиды и олигонуклеотиды присутствуют в 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 дополнительно содержит поверхностно-активное вещество, и отличающаяся тем, что по меньшей мере 90% липосом имеют диаметр меньше чем 5 мкм.
27. Композиция по п.25, отличающаяся тем, что популяция олигонуклеотидов содержится в популяции липосом.
28. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что композиция является лиофилизированной.
29. Способ уменьшения уровня экспрессии белка STAT3 в клетке, включающий в себя приведение в контакт клетки с композицией по п.1.
30. Фармацевтическая композиция для понижения уровня экспрессии белка STAT3 в клетке, содержащая композицию по п.18 и фармацевтически приемлемый носитель.
31. Способ доставки терапевтически эффективного количества олигонуклеотида в клетку для лечения рака или аутоиммунного заболевания, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.30.
32. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект является человеком.
33. Способ по п.31, отличающийся тем, что рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак простаты, меланому, рак толстой кишки, лейкоз, лимфому, глиобластому, остеосаркому, рак полости рта, рак яичников, рак матки, рак костей, рак мозга, рак простаты, рак почки, рак желудка, рак пищевода, рак прямой кишки, рак мочевого пузыря, рак яичка или рак печени.
34. Способ по п.31, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание представляет собой системную красную волчанку, спондилоартропатию, болезнь Шегрена, болезнь Крона, сахарный диабет, рассеянный склероз или ревматоидный артрит.
35. Способ по п.31, отличающийся тем, что композицию вводят подкожно, внутривенно или внутриванно.
36. Способ по п.31, дополнительно включающий в себя введение субъекту по меньшей мере второй противораковой терапии, где вторая противораковая терапия представляет собой хирургическую терапию, химиотерапию, лучевую терапию, криотерапию, гормонотерапию, иммунотерапию, противовирусную терапию, иммуносупрессивную терапию, антибактериальную терапию, антипаразитарную терапию, противогрибковую терапию или терапию цитокинами.



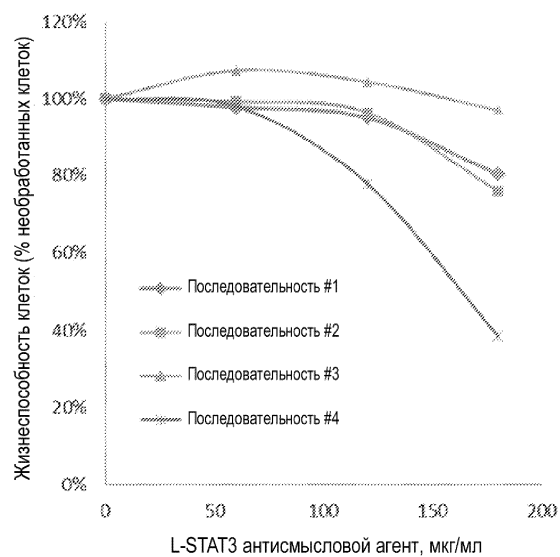
Фиг. 1

Клетки H1975

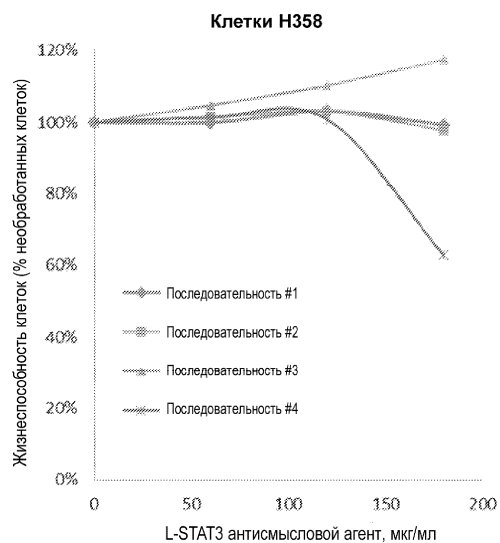


Фиг. 2А

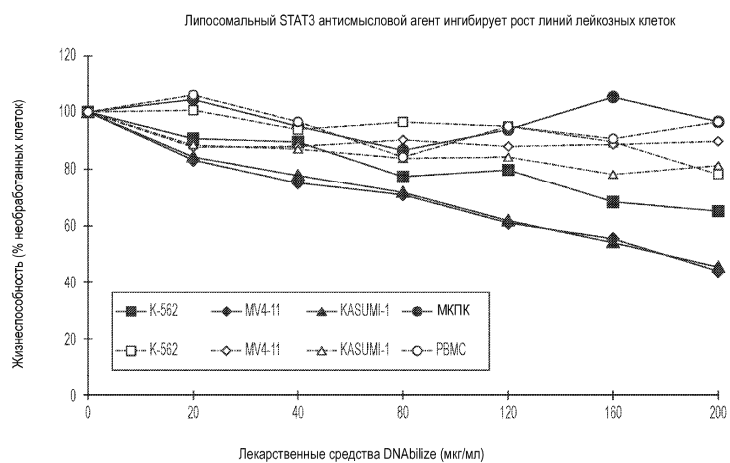
Клетки HCC827



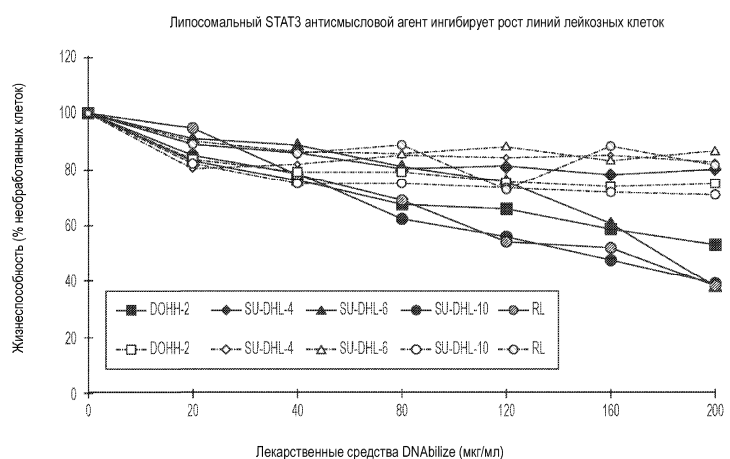
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 3А



Фиг. 3В

