



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 120026

(13) C2

(51) МПК

C07C 271/20 (2006.01)

C07C 217/08 (2006.01)

C07C 229/12 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 10393	(72) Винахідник(и):	Хейс Джеймс (СА), Вуд Марк (СА), Мартін Алан (СА)
(22) Дата подання заявки:	22.02.2013	(73) Власник(и):	АРБУТУС БІОФАРМА КОРПОРЕЙШН, 100-8900 Glenlyon Parkway, Burnaby, British Columbia V5J 5J8, Canada (CA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.09.2019	(74) Представник:	Слободянюк Тарас Олександрович, реєстр. №217
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/602,990	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011/143230 A1, 17.11.2011 US 2012/172411 A1, 05.07.2012 MUTHUSAMY JAYARAMAN ET AL., "Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION (20120820), vol. 51, no. 34, pages 8529-8533
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	24.02.2012		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.01.2015, Бюл.№ 1		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.09.2019, Бюл.№ 18		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2013/027469, 22.02.2013		

(54) ТРИАЛКІЛКАТІОННІ ЛІПІДИ І СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Цей винахід стосується композицій і способів для доставки терапевтичних агентів у клітини. Зокрема, вони включають нові, триалкільні, катіонні ліпіди і нуклеїнові кислотнo-ліпідні частинки, які забезпечують ефективну інкапсуляцію нуклеїнових кислот і ефективну доставку інкапсульованої нуклеїнової кислоти в клітини in vivo. Композиції за цим винаходом є дуже потужними, дозволяючи тим самим ефективно нейтралізувати конкретний цільовий білок у відносно низьких дозах.

UA 120026 C2

[0001] Ця заявка заявляє пріоритет на основі попередньої заявки США 61/602990, поданої 24 лютого 2012, яка включена у цей опис шляхом посилання у повному обсязі.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

I. Область техніки

5 [0002] Цей винахід відноситься до нових триалкіл катіонних ліпідів, ліпідним часткам, що містять один або більше триалкіл катіонних ліпідів, способом одержання часток ліпідів, а також способом доставки і введення ліпідних часток (наприклад, для лікування захворювання у ссавців).

II. Опис попереднього рівня техніки

10 [0003] Терапевтичні нуклеїнові кислоти включають, наприклад, малі інтерферуючі РНК (міРНК), мікроРНК (мікроРНК), антисмислові олігонуклеотиди, рибозими, плазмиди, і імуностимулюючі нуклеїнові кислоти, але, не обмежуючись ними. Ці нуклеїнові кислоти діють за допомогою різних механізмів. У разі інтерферуючих молекул, РНК, таких як міРНК і мікроРНК, ці нуклеїнові кислоти можуть знижувати регуляцію внутрішньоклітинного рівня специфічних білків за допомогою процесу, який називають РНК-інтерференцією (РНКі). Після введення
15 інтерферуючих РНК у цитоплазму клітини, ці двониткові конструкції РНК можуть зв'язуватися з білком, що називається RISC. Кодуюча нитка інтерферуючої РНК, що переміщена з комплексу RISC, забезпечує матрицю всередині RISC, яка може розпізнавати і зв'язувати мРНК з комплементарною послідовністю зв'язаної інтерферуючої мРНК. Зв'язавши комплементарну мРНК, RISC комплекс розщеплює РНК і звільняє розщеплені нитки. РНКі може забезпечити
20 зниження регуляції специфічних білків за допомогою цільового специфічного знищення відповідних мРНК, які кодують синтез білка.

[0004] Терапевтичне застосування РНКі дуже широке, оскільки інтерферуючі РНК конструкції можуть бути синтезовані з будь-якою нуклеотидною послідовністю, направленою проти білка-мішені. На сьогоднішній день, міРНК конструкції показали здатність специфічно знижувати регуляцію білка-мішені як *in vitro*, так і *in vivo* модельних умовах. Крім того, міРНК конструкції на даний час оцінюються в клінічних дослідженнях.

[0005] Проте, дві проблеми на даний час стоять перед, інтерферуючими РНК конструктами, по-перше, їх сприйнятливість до нуклеазного розщеплювання в плазмі і, по-друге, їх обмежена
30 здатність одержувати доступ до внутрішньоклітинного простору, де вони можуть зв'язувати RISC системно, як вільні, інтерферуючі РНК молекули. Ці дволанцюжкові конструкції можуть бути стабілізовані шляхом введення хімічно модифікованих нуклеотидних лінкерів у молекули, наприклад, фосфотіоатних груп. Проте, такі хімічно модифіковані лінкери забезпечують лише обмежений захист від нуклеази і можуть знижувати активність конструкції. Внутрішньоклітинна
35 доставка інтерферуючих РНК може бути полегшена за рахунок використання систем-носіїв, таких як полімери, катіонні ліпосоми, або шляхом ковалентного приєднання групи холестерину до молекули. Проте, покращення систем доставки необхідне для збільшення специфічної активності інтерферуючих РНК молекул, таких як міРНК і мікроРНК і для зменшення або усунення потреби у хімічно модифікованих нуклеотидних лінкерах.

40 [0006] Крім того, залишаються проблеми з обмеженою здатністю терапевтичних нуклеїнових кислот, таких як що інтерферуючі РНК, пересікати клітинні мембрани (див., Vlassov et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1197:95-1082 (1994)) і проблеми, пов'язані з системною токсичністю, такі як комплемент-опосередкована анафілаксія, змінені коагулятивні властивості, і цитопенія (Galbraith et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.*, 4:201-206 (1994)).

45 [0007] У спробі покращити ефективність, дослідники також використовували системи-носії на основі ліпідів, щоб доставити хімічно модифіковані або немодифіковані терапевтичні нуклеїнові кислоти. Zelphati et al. (*J. Contr. Rel.*, 41:99-119 (1996)) описує використання аніонних (звичайних) ліпосом, чутливих до рН ліпосом, імуноліпосом, злитих ліпосом і катіонних ліпідних/антисмислових агрегатів. Аналогічно, міРНК були системно введені в катіонні ліпосоми, і ці нуклеїнові кислотні-ліпідні частки, як повідомляється, забезпечують покращену знижуючу
50 регуляцію білків-мішеней у ссавців, включаючи приматів (Zimmermann et al., *Nature*, 441: 111-114 (2006)).

[0008] Не дивлячись на цей прогрес, залишається потреба у даній області для покращення ліпідно-терапевтичних композицій нуклеїнових кислот, які придатні для загального
55 терапевтичного використання. Бажано, ці композиції інкапсулюватимуть нуклеїнові кислоти з високою ефективністю, мають високе співвідношення препарат:ліпід, захищають інкапсульовану нуклеїнову кислоту від деградації і розщеплювання в сироватці, прийнятні для системної доставки, а також забезпечують внутрішньоклітинну доставку інкапсульованої нуклеїнової кислоти. Крім того, ці частки нуклеїнових кислот, ліпідів, мають бути добре переносимими, і
60 забезпечувати адекватний терапевтичний індекс, такий, що лікування пацієнта ефективною

дозою нуклеїнової кислоти не пов'язане з істотною токсичністю і ризиком для пацієнта.

Короткий опис винаходу

[0009] Цей винахід відноситься до нових триалкіл катіонних (аміно) ліпідів і ліпідним часткам, що містять ці ліпіди, які є вигідними для *in vivo* доставки нуклеїнових кислот, а також кислотно-ліпідних композицій нуклеїнових часток, придатних *in vivo* для терапевтичного застосування. Цей винахід також відноситься до способів одержання таких композицій, а також способів введення нуклеїнових кислот у клітини за допомогою цих композицій, наприклад, для лікування різних хворобливих станів. Цей винахід також включає всі нові сполуки і проміжні сполуки, розкриті у цьому документі.

[0010] Як описано у прикладі 2 у цьому документі, триалкіл катіонні ліпіди за цим винаходом є потужнішими, у мишачому АроВ міРНК аналізі, ніж інші ідентичні ліпіди, що мають довші алкільні ланцюги.

[0011] В одному з аспектів цей винахід відноситься до катіонних ліпідів, що мають структурну формулу (I):

X-A-Y-Z; (I)

або їх солей, наприклад, їх фармацевтично прийнятних солей, де:

X є алкіламіногрупою;

A є від C₁ до C₆ необов'язково заміщеним алкілом, де вказаний необов'язково заміщений C₁-C₆-алкіл може бути насиченим або ненасиченим, і де A може бути присутнім або може не бути присутнім;

Y вибраний з групи, що складається з кеталю, складного ефіру, необов'язково заміщеного карбамата, ефіру, і необов'язково заміщеного аміда; і

Z є гідрофобним фрагментом, що складається з трьох алкільних ланцюгів, де кожен з алкільних ланцюгів має довжину від C₈ до C₁₁, де кожен з трьох алкільних ланцюгів може бути насиченим або ненасиченим, і де кожен з трьох алкільних ланцюгів є необов'язково заміщеним.

[0012] Відносно ліпідів за формулою (I), типові приклади алкіламіногруп складаються з диметиламіно-, діетиламіно-, і етилметиламіногруп.

[0013] Знову відносно ліпідів за формулою (I), типовий приклад присутності необов'язкового замісника у вигляді карбамата і амідної групи є насиченою або ненасиченою алкільною групою (наприклад, C₁-C₆ алкіл).

[0014] Знову відносно ліпідів за формулою (I), типовий приклад необов'язкового замісника, який може бути присутнім на одній або більше з трьох алкільних ланцюгів гідрофобного фрагмента Z є гідроксильною групою.

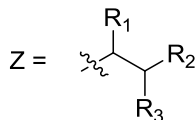
[0015] Знову відносно ліпідів за формулою (I), має бути зрозуміло, що там, де алкільний ланцюг гідрофобного фрагмента Z містить один або декілька подвійних зв'язків або потрійних зв'язків, алкільний ланцюг називають ненасиченим.

[0016] Знову відносно ліпідів за формулою (I), має бути зрозуміло, щоб уникнути сумнівів, що один або більше алкільний ланцюг, що містить гідрофобний фрагмент Z може включати циклоалкільну групу (наприклад, циклопропіл).

[0017] Знову відносно ліпідів за формулою (I), слід розуміти, що термін "ефір" містить складні ефіри, що мають структуру -C(=O)O- або -OC(=O)-. Термін "амід" містить амід, що мають структуру -C(=O)NR- або -NR(=O)C-. Термін "карбамат" містить карбамати, що мають структуру -OC(=O)NR- або -NRC(=O)O-.

[0018] Ліпіди за формулою (I) можуть бути використані, наприклад, для виготовлення ліпідних часток за цим винаходом, які корисні, наприклад, для доставки терапевтичних агентів (наприклад, біологічно активних молекул нуклеїнових кислот, таких як міРНК) ссавцеві (наприклад, людині), який потребує цього.

[0019] У деяких варіантах реалізації ліпідів за формулою (I), Z має формулу:



де R₁, R₂ і R₃, кожен окремо, незалежно вибрані з групи, що складається з C₈ - C₁₁ алкілу, де кожен з R₁, R₂, і R₃ незалежно один від одного може бути насиченим або ненасиченим, і де кожен з R₁, R₂, і R₃ є необов'язково заміщеним.

[0020] У додатковому аспекті цей винахід відноситься до ліпідних часток, що містять один або більше з вищезгаданих катіонних ліпідів за формулою I або їх солей, наприклад,

фармацевтично прийнятних солей. У деяких варіантах реалізації ліпідні частки додатково містять один або більше некатіонних ліпідів, такі як нейтральні ліпіди. У деяких інших варіантах реалізації ліпідні частки додатково містять один або більше кон'югованих ліпідів, здатних знижувати або інгібувати агрегацію часток. У додаткових варіантах реалізації ліпідні частки

5 додатково містять один або більше активних агентів або терапевтичних агентів.

[0021] У деяких варіантах реалізації, некатіонний ліпідний компонент ліпідної частки може містити фосфоліпід, холестерин (або похідне холестерину), або їх суміш. У одному конкретному варіанті реалізації фосфоліпід містить дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC), дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC), або їх суміш. У деяких варіантах реалізації цього

10 винаходу кон'югований ліпідний компонент з ліпідної частки містить поліетиленгліколь (PEG)-ліпідний кон'югат. У деяких випадках PEG-ліпідний кон'югат містить PEG-діацилгліцерол (PEG-DAG) кон'югат, PEG-діалкілоксипропіловий (PEG-DAA) кон'югат, або їх суміш. У інших варіантах реалізації ліпідний кон'югат містить поліоксазолін (POZ) - ліпідний кон'югат, такий як кон'югат POZ-DAA.

15 [0022] У деяких варіантах реалізації активна речовина або терапевтичний агент включає нуклеїнову кислоту. В деяких випадках, нуклеїнова кислота містить інтерферуючу молекулу РНК, таку як, наприклад, у міРНК, аіРНК, мікроРНК, дисер-субстратну дсРНК, мхРНК, або їх суміші. У деяких інших випадках, нуклеїнова кислота містить одноланцюжкову або

20 дволанцюжкову ДНК, РНК або ДНК/РНК гібрид такі, наприклад, як антисмисловий олігонуклеотид, рибозим, плазмід, імуностимулюючі олігонуклеотиди або їх суміші.

[0023] В інших варіантах реалізації активний агент або терапевтичний агент повністю інкапсулюються у ліпідну частину ліпідної частки таким чином, що активний агент або терапевтичний агент у ліпідній частці є стійкими у водному розчині до ферментативного розщеплювання, наприклад, за допомогою нуклеази або протеази. В інших варіантах реалізації

25 ліпідні частки, по суті, є нетоксичними для ссавців, таких як люди.

[0024] У деяких варіантах реалізації, цей винахід забезпечує ліпідні частки (наприклад, LNP), включають: (a) одну або декілька нуклеїнових кислот, таких як інтерферуючі молекули РНК; (b) один або декілька катіонних ліпідів за формулою I або їх солей, наприклад, фармацевтично прийнятних солей; (c) один або декілька некатіонних ліпідів; і (d) один або більше кон'югованих

30 ліпідів, які інгібують агрегацію часток.

[0025] У деяких варіантах реалізації, цей винахід забезпечує ліпідні частки (наприклад, LNP), що містять: (a) одну або декілька нуклеїнових кислот; (b) один або декілька катіонних ліпідів за формулою I або їх солей, наприклад, фармацевтично прийнятних солей, що містять від близько 50 моль % до близько 85 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) один або декілька некатіонних ліпідів, що містять від близько 13 моль % до близько 49,5 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) один або більше кон'югованих ліпідів, які інгібують агрегацію часток, що містять від близько 0,5 моль % до близько 2 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

35 (c) один або декілька некатіонних ліпідів, що містять від близько 13 моль % до близько 49,5 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) один або більше кон'югованих ліпідів, які інгібують агрегацію часток, що містять від близько 0,5 моль % до близько 2 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0026] В одному аспекті варіанту реалізації, ліпідні частки (наприклад, LNP) містять: (a) нуклеїнову кислоту; (b) катіонний ліпід за формулою I або його сіль, наприклад, фармацевтично прийнятну сіль, що містить від близько 52 моль % до близько 62 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) суміш фосфоліпідів і холестерину або його похідного, що містить від близько 36 моль % до близько 47 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) PEG-ліпідний кон'югат, що містить від близько 1 моль % до близько 2 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Цей варіант реалізації нуклеїнових кислотно-ліпідних часток зазвичай називають у даному описі як "1:57" композиція. В одному конкретному варіанті реалізації композиція 1:57 складається з чотирьохкомпонентної системи, що містить близько 1,4 моль % PEG-ліпідного кон'югата (наприклад, PEG2000-C-DMA), близько 57,1 моль % катіонного ліпиду за формулою I або його сіль, близько 7,1 моль % DPPC (або DSPC), і близько 34,3 моль

50 % холестерину (або їх похідних).

[0027] У іншому аспекті цього варіанту реалізації, ліпідна частка (наприклад, LNP) містить: (a) нуклеїнову кислоту; (b) катіонний ліпід за формулою I або його сіль, наприклад, фармацевтично прийнятну сіль, що містить від близько 56.5 моль % до близько 66.5 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) холестерин або його похідне, що містить від близько 31,5 моль % до близько 42,5 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) PEG-ліпідний кон'югат, що містить від близько 1 моль % до близько 2 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Цей варіант реалізації нуклеїнової кислотно-ліпідної частки зазвичай називається в цьому описі як "1:62" композиція. В одному конкретному варіанті реалізації композиція 1:62 є системою з трьох компонентів, яка є вільною від фосфоліпиду і

60 містить близько 1,5 моль % PEG-ліпідного кон'югата (наприклад, PEG2000-C-DMA), близько

61.5 моль % катіонного ліпиду за формулою I або його солі, і близько 36,9 моль % холестерину (або його похідного).

[0028] Додаткові варіанти реалізації, що відносяться до 1:57 і 1:62 композиціям, описані у РСТ публікації WO 09/127060, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0029] У інших варіантах реалізації цей винахід пропонує ліпідні частки (наприклад, LNP), що містять: (a) одну або декілька нуклеїнових кислот; (b) один або декілька катіонних ліпідів за формулою I або II або їх солей, наприклад, фармацевтично прийнятних солей, що містять від близько 2 моль % до близько 50 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) один або більше некатіонний ліпід, що містить від близько 5 моль % до близько 90 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) один або більше кон'югований ліпід, який інгібує агрегацію часток, що містить від близько 0,5 моль % до близько 20 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0030] В одному аспекті цього варіанту реалізації, ліпідна частка (наприклад, LNP) містить: (a) нуклеїнові кислоти; (b) катіонний ліпід за формулою I або його сіль, наприклад, фармацевтично прийнятну сіль, що містить від близько 30 моль % до близько 50 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) суміш фосфоліпідів і холестерину або його похідного, що містить від близько 47 моль % до близько 69 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) PEG-ліпідного кон'югата, що містить від близько 1 моль % до близько 3 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Цей варіант реалізації ліпідних часток, як правило, згадується у цьому документі як "2:40" композиція. В одному конкретному варіанті реалізації композиція 2:40 є системою з чотирьох компонентів, які містяться у близько 2 моль % PEG-ліпідних кон'югатів (наприклад, PEG2000-C-DMA), близько 40 моль % катіонного ліпиду за формулою I або його солі, близько 10 моль % DPPC (або DSPC), і близько 48 моль % холестерину (або його похідного).

[0031] У ще одному варіанті реалізації цей винахід відноситься до нуклеїнових кислотно-ліпідних часток (наприклад, LNP) що містять: (a) одну або декілька нуклеїнових кислот; (b) один або декілька катіонних ліпідів за формулою I або їх солей, наприклад, фармацевтично прийнятних солей, що містять від близько 50 моль % до близько 65 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) один або більше некатіонних ліпідів, що містять від близько 25 моль % до близько 45 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) один або більше кон'югованих ліпідів, які інгібують агрегацію часток, що містяться від близько 5 моль % до близько 10 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0032] У одному аспекті цього варіанту реалізації нуклеїнова кислотно-ліпідна частка містить: (a) нуклеїнові кислоти; (b) катіонний ліпід за формулою I або його сіль, наприклад, його фармацевтично прийнятну сіль, що містить від близько 50 моль % до близько 60 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) суміш фосфоліпідів і холестерину або його похідного, що містить від близько 35 моль % до близько 45 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) PEG-ліпідний кон'югат, що містить від близько 5 моль % до близько 10 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Цей варіант реалізації нуклеїнових кислотно-ліпідних часток зазвичай називають у даному описі як "7:54" композиція. В деяких випадках, некатіонна ліпідна суміш у композиції 7:54 містить: (i) фосфоліпід від близько 5 моль % до близько 10 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (ii) холестерин або його похідне від близько 25 моль % до близько 35 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. У одному конкретному варіанті реалізації композиція 7:54 є системою з чотирьох компонентів, яка містить близько 7 моль % PEG-ліпідного кон'югата (наприклад, PEG750-C-DMA), близько 54 моль % катіонного ліпиду за формулою I або його сіль, близько 7 моль % DPPC (або DSPC), і близько 32 моль % холестерину (або його похідного).

[0033] В іншому аспекті цього варіанту реалізації нуклеїнова кислотно-ліпідна частка включає: (a) нуклеїнову кислоту; (b) катіонний ліпід за формулою I або його сіль, наприклад, його фармацевтично прийнятну сіль, що містить від близько 55 моль % до близько 65 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; (c) холестерин або його похідне, що містить від близько 30 моль % до близько 40 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці; і (d) PEG-ліпідний кон'югат, що містить від близько 5 моль % до близько 10 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Цей варіант реалізації нуклеїнової кислотно-ліпідної частки зазвичай називають у цьому описі як "7:58" композиція. В одному конкретному варіанті реалізації композиція 7:58 є системою з трьох компонентів, яка є вільною від фосфоліпиду і містить близько 7 моль % PEG-ліпідного кон'югата (наприклад, PEG750-C-DMA), близько 58 моль % катіонного ліпиду за формулою I або його сіль, і близько 35 моль % холестерину (або його похідного).

[0034] Додаткові варіанти реалізації, що відносяться до 7:54 і 7:58 композиціям, описані в опублікованій патентній заявці № US2011/0076335, поданій 30 червня 2010, опис якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

5 [0035] Цей винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, що містять ліпідні частки, такі як нуклеїнові кислотні-ліпідні частки (наприклад, LNP) і фармацевтично прийнятні носії.

10 [0036] В іншому аспекті цей винахід відноситься до способів введення одного або більше терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти, у клітину, включаючи контакт клітини з ліпідною часткою, описаною у цьому документі (наприклад, LNP). У одному варіанті реалізації клітина є клітиною ссавця і ссавцем є людина.

15 [0037] У ще одному аспекті, цей винахід відноситься до способів доставки в природних умовах одного або декількох терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти, причому спосіб включає введення ссавцеві ліпідної частки, описаної в цьому документі (наприклад, LNP). У деяких варіантах реалізації цього винаходу ліпідні частки (наприклад, LNP) вводять одним з наступних шляхів введення: пероральним, інтраназальним, внутрішньовенним, внутрішньочеревинним, внутрішньом'язовим, внутрішньосуглобним, внутрішньоосередковим, внутрішньотрахеальним підшкірним, і внутрішньошкірним. У конкретних варіантах реалізації частки ліпідів (наприклад, LNP) вводять системно, наприклад, за допомогою ентерального або парентерального шляхів введення. У бажаних варіантах реалізації ссавець є людиною.

20 [0038] В іншому аспекті, цей винахід відноситься до способів лікування захворювання або розладу у ссавця, який потребує цього, що включає введення вказаному ссавцеві терапевтично ефективною кількістю ліпідної частки (наприклад, LNP) що містить один або більше терапевтичний агент, такий як нуклеїнові кислоти. Необмежуючі приклади захворювань або порушень містять вірусну інфекцію, захворювання або порушення печінки і рак. Бажано ссавець є людиною.

25 [0039] У деяких варіантах реалізації цей винахід відноситься до способів лікування захворювання або розладу печінки шляхом введення нуклеїнової кислоти, такої як інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) у нуклеїнових кислотні-ліпідних частках (наприклад, LNP), окремо або в комбінації з гіполіпідемічним агентом. Приклади ліпідних захворювань і розладів містять дисліпідемії (наприклад, гіперліпідемії, такі як підвищення рівня тригліцеридів (гіпертригліцеридемія) та/або підвищення рівня холестерину (гіперхолестеринемія)), атеросклероз, коронарна хвороба серця, захворювання коронарної артерії, атеросклерозне захворювання серцево-судинної системи (CVD), жирові хвороби печінки (стеатоз печінки), порушення ліпідного обміну, порушення метаболізму холестерину, цукровий діабет (у тому числі цукровий діабет 2 типу), ожиріння, серцево-судинні захворювання, а також інші розлади, пов'язані з порушенням метаболізму, але не обмежуються ними. Не обмежуючі приклади гіполіпідемічних агентів містять статини, фібрати, езетиміди, тіазолідиндіони, ніацини бета-блокатори, нітрогліцерини, антагоністи кальцію, і риб'ячий жир.

30 [0040] У одному конкретному варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу зниження або зменшення рівня холестерину у ссавця (наприклад, людини), який потребує цього (наприклад, ссавцеві з рівнем холестерину у крові), причому спосіб включає введення ссавцеві терапевтично ефективною кількістю нуклеїнових кислотні-ліпідних часток (наприклад, композиція LNP), описаної у цьому документі, що містять одну або більше інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК), які призначаються для одного або декількох генів, пов'язаних з метаболічними захворюваннями і розладами. В іншому конкретному варіанті реалізації цей винахід відноситься до способу зниження або зменшення рівня тригліцеридів в організмі ссавця (наприклад, людини), який потребує цього (наприклад, ссавця з підвищеним рівнем тригліцеридів у крові), причому спосіб включає введення ссавцеві терапевтично ефективною кількістю нуклеїнової кислотні-ліпідної частки (наприклад, композиція LNP), описаної у цьому документі, що містить одну або декілька інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК), які призначаються для одного або декількох генів, пов'язаних з метаболічними захворюваннями і розладами. Ці способи можуть бути проведені in vitro з використанням стандартних технічних прийомів з культурою тканини або in vivo шляхом введення інтерферуючої РНК (наприклад, міРНК) за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області. У бажаних варіантах реалізації інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) надходить у клітини печінки (наприклад, гепатоцити) у ссавця, такого як людина.

55 [0041] Додаткові варіанти реалізації, пов'язані з лікуванням захворювання печінки або порушенням використання ліпідних часток описані, наприклад, у РСТ заявці РСТ/CA2010/000120, поданій 26 січня 2010, і заявці на патент США № 2006/0134189, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

60 [0042] В інших варіантах реалізації цей винахід відноситься до способів лікування клітинного

проліферативного порушення, такого як рак, шляхом введення нуклеїнової кислоти, такої як інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) у нуклеїнових кислотно-ліпідних частках (наприклад, LNP), окремо або в комбінації з хіміотерапевтичними препаратами. Ці методи можуть бути виконані *in vitro* з використанням стандартних технічних прийомів з культурою тканини або *in vivo* шляхом введення інтерферуючої РНК (наприклад, міРНК) за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області. У бажаних варіантах реалізації інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) надходить у клітину раку у ссавця, такого як людина, окремо або в комбінації з хіміотерапевтичним препаратом. Нуклеїнові кислотно-ліпідні частки і хіміотерапевтичні препарати також можуть бути введені спільно із звичайними гормональними, імунотерапевтичними і радіотерапевтичними агентами.

[0043] Додаткові варіанти реалізації, пов'язані з лікуванням клітинного проліферативного порушення, що використовують ліпідну частку, описані, наприклад, у РСТ публікації WO 09/082817, заявці на патент США №2009/0149403, і РСТ публікації WO 09/129319, розкриття яких включене у цей опис як посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0044] У ще одному варіанті реалізації цей винахід відноситься до способів профілактики або лікування вірусної інфекції, такий як ареновірус (наприклад, вірус лихоманки Ласса) або філовірус (наприклад, вірус Ебола, вірус Марбург і так далі), інфікування якими призводить до геморагічної лихоманки або гепатиту (наприклад, вірус гепатиту С), які викликають гострі або хронічні гепатити шляхом введення нуклеїнової кислоти, такої як інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) у нуклеїнових кислотно-ліпідних частках (наприклад, LNP), окремо або у поєднанні з введенням звичайного засобу, що застосовується для лікування або полегшення вірусного стану або будь-якої з ознак, пов'язаних з ним. Ці способи можуть бути виконані *in vitro* з використанням стандартних технічних прийомів з культурою тканини або *in vivo* шляхом введення інтерферуючої РНК з використанням будь-яких засобів, відомих у даній області. У деяких варіантах реалізації, інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) доставляється у клітини, тканини або органи ссавця, такого як людина, які інфіковані та/або допускається зараження вірусом геморагічної лихоманки, таких як, наприклад, клітин ретикулоендотеліальної системи (наприклад, моноцитів, макрофагів і так далі). У деяких інших варіантах реалізації, інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) доставляється у клітини, тканини або органи ссавця, такого як людина, які інфіковані та/або допускається зараження вірусом гепатиту, таких як, наприклад, клітин печінки (наприклад, гепатоцитів).

[0045] Додаткові варіанти реалізації, що відносяться до профілактики або лікування вірусної інфекції з використанням ліпідної частки, описані, наприклад, у заявці на патент США № 2007/0218122, заявці на патент США 2007/0135370, і РСТ заявці РСТ/CA2010/000444, що називається "Композиції і способи для пригнічення експресії вірусу гепатиту С", поданої 19 березня 2010, описи яких наведені у цьому документі як посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0046] Ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP), що містять один або більше катіонний ліпід за формулою I або його солі, наприклад, фармацевтично прийнятні солі, є особливо бажаними, і є прийнятними для використання при введенні нуклеїнових кислот, таких як інтерферуючі РНК, суб'єктові (наприклад, ссавцеві, такому як людина), оскільки вони стабільні в обігу, мають необхідний розмір для фармакодинамічної поведінки при доступі до екстраваскулярним сайтам і здатні досягати популяції клітин-мішеней.

[0047] Інші цілі, ознаки і переваги цього винаходу будуть очевидні для фахівця у даній області з наступного детального опису і фігур.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

I. Вступ

[0048] Цей винахід заснований, частково, на відкритті нових катіонних (аміно) ліпідів, які забезпечують переваги при використанні ліпідних часток для доставки *in vivo* активного або терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота, у клітину ссавця. Зокрема, цей винахід відноситься до композиції нуклеїнових кислотно-ліпідних часток, що включають один або новіший катіонний ліпід, описаний у цьому документі, які забезпечують підвищення активності нуклеїнової кислоти (наприклад, інтерферуючої РНК) і покращують переносимість композицій *in vivo*, внаслідок чого значно збільшується терапевтичний індекс у порівнянні з композиціями нуклеїнових кислотно-ліпідних часток, описаних вище.

[0049] У конкретних варіантах реалізації, цей винахід забезпечує нові катіонні ліпіди, які дозволяють розробити покращені композиції для *in vitro* і *in vivo* доставок інтерферуючих РНК, таких як міРНК. Показано, що у цьому документі ці покращувані композиції ліпідних часток ефективні при знижувачій регуляції (наприклад, виключенні) рівнів білка та/або рівнів мРНК генів-мішеней. Крім того, в цьому документі показано, що активність цих покращених композицій

ліпідних часток залежить від присутності нових катіонних ліпідів згідно винаходу.

[0050] Ліпідні частки і композиції за цим винаходом можуть бути використані для різних цілей, у тому числі доставки інкапсульованих або зв'язаних (наприклад, комплексів) терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти у клітини, як *in vitro*, так і *in vivo*. Відповідно, цей винахід також відноситься до способів лікування захворювань або порушень у суб'єктів, які потребують цього, шляхом контакту суб'єкта з ліпідною часткою, яка інкапсулює або зв'язує відповідний терапевтичний агент, який відрізняється тим, що ліпідна частка містить один або більше нових катіонних ліпідів, описаних у цьому документі.

[0051] Як описано у цьому документі, ліпідні частки за цим винаходом особливо корисні для доставки нуклеїнових кислот, у тому числі, наприклад, РНК-інтерферуючих молекул, таких як міРНК. Таким чином, можуть бути використані частки ліпідів і композиції за цим винаходом для зниження експресії генів-мішеней і білків *in vitro* і *in vivo* шляхом контактування клітин з ліпідною часткою, що містить один або більше нових катіонних ліпідів, описаних у цьому документі, в якому ліпідна частка інкапсулює або зв'язує нуклеїнову кислоту, яка зменшує експресію генів-мішеней (наприклад, міРНК). Альтернативно, ліпідні частки і композиції за цим винаходом можуть бути використані для збільшення експресії цільового білка *in vitro* і *in vivo* шляхом контакту клітин з ліпідною часткою, що містить один або більше нових катіонних ліпідів, описаних у цьому документі, який інкапсульований у ліпідну частку або пов'язаний з нуклеїною кислотою, що підвищує експресію бажаного білка (наприклад, плазмиду, що кодує бажаний білок).

[0052] Різні прикладні варіанти реалізації катіонних ліпідів за цим винаходом, ліпідних часток і композицій, що їх містять, і їх використання для доставки активних або терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти, щоб модулювати експресії генів і білків, детальніше описані нижче.

II. Визначення

[0053] У цьому описі наступні терміни мають значення, закріплені за ними, якщо не вказане інше.

[0054] Термін "близько", використовуваний у зв'язку з кількістю компонента в ліпідній частці або композиції за цим винаходом містить значення, плюс або мінус 5% від вказаної кількості компонента (наприклад, близько 10% охоплює значення від 9,5% до 10,5%). Термін "близько", отже, також містить значення, плюс або мінус 1%, 2%, 3%, або 4% від вказаної кількості компонента.

[0055] Терміни "інтерферуючі РНК" або РНКі" або "інтерферуючі послідовності РНК", що використовуються у цьому документі, включають одноланцюжкові РНК (наприклад, зрілі мікроРНК, ссРНК олігонуклеотиди, ссДНК олігонуклеотиди) або дволанцюжкові РНК (тобто, дуплекс РНК, такі як міРНК, дисер-субстратні длРНК, мхРНК, аіРНК, або пре-мікроРНК), які здатні зменшувати або інгібувати експресію гена-мішені або послідовності (наприклад, безпосереднім втручанням у деградацію або інгібуванням трансляції мРНК, комплементом послідовності інтерферуючої РНК), коли інтерферуюча РНК знаходиться у тій же клітині, що і ген-мішень або послідовність. Інтерферуючі РНК, таким чином, відносяться до одноланцюжкових РНК, комплементарним послідовності мРНК-мішені або дволанцюжкової РНК, утвореної двома комплементарними нитками або однією, самостійно комплементарним ланцюгом. Інтерферуючі РНК можуть мати істотну або повну тотожність з цільовим геном або послідовністю, або можуть містити ділянку невідповідності (тобто невідповідний мотив). Послідовність інтерферуючих РНК може відповідати цільовому гену повної довжини, або його підпослідовності. Бажано, інтерферуючі РНК-молекули синтезовані хімічно.

[0056] Інтерферуючі РНК включають ті, що "малі-інтерферуючі РНК" або "міРНК", наприклад, інтерферуючі РНК з близько 15-60, 15-50 або 15-40 (дуплекс) нуклеотидів, типовіше близько з 15-30, 15-25, або 19-25 (дуплекс) нуклеотидів у довжину, і бажано близько з 20-24, 21-22, або 21-23 або (дуплекс) нуклеотидів у довжину (наприклад, кожна комплементарна послідовність у дволанцюжковій міРНК представлена 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, або 19-25 нуклеотидами в довжину, близько 20-24, 21-22, або 21-23 нуклеотидами у довжину, і дволанцюжкові міРНК представлені близько 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, або 19-25 парами основ у довжину, бажано близько 18-22, 19-20, або 19-21 парами основ у довжину). МіРНК дуплекси можуть включати 3' виступаючих від близько 1 до близько 4 нуклеотидів або від близько 2 до близько 3 нуклеотидів і 5' фосфат кінців. Приклади міРНК містять дволанцюжкову молекулу полінуклеотиду, зібрану з двох окремих скручених молекул, в якій один ланцюг є смисловим ланцюгом, а інший є додатковим антисмисловим ланцюгом; дволанцюжкову молекулу полінуклеотиду, зібрану з одноланцюжкової молекули, де смислова і антисмислова області зв'язані за допомогою нуклеїнового кислотно-основного або нуклеїнового кислотно-основного лінкера; дволанцюжкову молекулу полінуклеотиду з шпилькою вторинної структури, що має

самокомплементарну смислову і антисмислову області; і кільцеву одноланцюжкову молекулу полінуклеотиду з двома або більше структурами петлі і штока, що має самокомплементарну смислову і антисмислову області, де круговий полінуклеотид може бути оброблений *in vivo* або *in vitro*, щоб сформувати активну дволанцюжкову молекулу міРНК.

[0057] Бажано, міРНК є хімічно синтезованими. МіРНК також можуть бути отримані шляхом розщеплювання довгої длРНК (наприклад, длРНК більшої, ніж близько 25 нуклеотидів у довжину) за допомогою РНКаз III або Дайсер *E. coli*. Ці ферменти перетворюють длРНК на біологічно активну міРНК (див., наприклад, Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9942-9947 (2002); Calegari et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:14236 (2002); Byrom et al., *Ambion TechNotes*, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., *Nucleic Acids Res.*, 31:981-987 (2003); Knight et al., *Science*, 293:2269-2271 (2001); and Robertson et al., *J. Biol. Chem.*, 243:82 (1968)). Бажано, длРНК має від щонайменше 50 нуклеотидів до близько 100, 200, 300, 400, або 500 нуклеотидів у довжину. ДлРНК може мати довжину 1000, 1500, 2000, 5000 нуклеотидів у довжину, або більше. ДлРНК може кодувати весь транскрипт гена або частковий транскрипт гена. У деяких випадках, міРНК можуть бути закодовані за допомогою плазміди (наприклад, прописані у вигляді послідовностей, які автоматично складаються в дуплексів з шпильковими петлями).

[0058] Як використовується у цьому документі, терміни "мотив невідповідності" або "ділянка невідповідності" відносяться до частини послідовності інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК), яка не має 100% комплементарності з цільовою послідовністю. Інтерферуюча РНК може мати щонайменше один, два, три, чотири, п'ять, шість, або більше невідповідних областей. Невідповідні області можуть бути безперервними або можуть бути розділені за допомогою 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або більше нуклеотидів. Невідповідні мотиви або ділянки можуть складатися з одного нуклеотиду або можуть містити два, три, чотири, п'ять, або більше нуклеотидів.

[0059] Фраза "інгібувати експресію гена-мішені" відноситься до здатності інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК), або інших терапевтичних агентів вимикати, зменшувати або інгібувати експресію гена-мішені. Щоб досліджувати міру виключення генів, тестовані зразок (наприклад, зразок клітин у культурі, експресуючих ген-мішень) або тестований ссавець (наприклад, ссавець, такий як людина або тваринна модель, така як модель гризуна (наприклад, миші) або нелюдського примату (наприклад, мавпи)) приводять у контакт з інтерферуючою РНК (наприклад, міРНК), що вимикає, зменшує або інгібує експресію гена-мішені. Експресія гена-мішені у досліджуваному зразку або піддослідній тварині у порівнянні з експресією гена-мішені у контрольному зразку (наприклад, зразку клітин у культурі, експресуючих ген-мішень) або контрольному ссавцеві (наприклад, ссавцеві, такому як людина або тваринна модель, наприклад, модель гризуна (наприклад, миші) або нелюдського примату (наприклад, мавпи)), що не контактує з або не піддається введенню інтерферуючої РНК (наприклад, міРНК). Експресії гена-мішені у контрольному зразку або контрольному ссавцеві може бути надане значення 100%. У конкретних варіантах реалізації, виключення, інгібування або зниження експресії гена-мішені досягається, коли рівень експресії гена-мішені в досліджуваному зразку або тестованому ссавцеві у порівнянні з рівнем експресії гена-мішені у контрольному зразку або контрольному ссавцеві складає близько 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15 %, 10%, 5% або 0%. Іншими словами, інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) вимикає, зменшує або інгібує експресію гена-мішені щонайменше близько на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% або 100% у тестованому зразку, або тестованому ссавцеві у порівнянні з рівнем експресії генів-мішеней у контрольному зразку або контрольному ссавцеві, які не контактують з або не піддаються введенню інтерферуючої РНК (наприклад, міРНК). Відповідні аналізи для визначення рівня експресії гена-мішені включають, без обмеження, рівні тестування білка або мРНК з використанням способів, відомих фахівцям у даній області, таких як, наприклад, дот блот аналіз, Нозерн-блоттинг, *in situ* гібридизація, ELISA, імунопреципітація, функції ферментів, а також фенотипічні аналізи, відомі фахівцям у даній області.

[0060] Термін "ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість" активного агента або терапевтичного агента, такого як інтерферуюча РНК, є кількістю, достатньою для одержання бажаного ефекту, наприклад, інгібування експресії послідовності-мішені у порівнянні з нормальним рівнем експресії, виявленому у відсутності інтерферуючих РНК. Інгібування експресії послідовності-мішені або гена-мішені досягається тоді, коли значення, отримане за допомогою інтерферуючих РНК по відношенню до контролю складає близько 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% або 0%. Відповідні аналізи для виміру експресії гена-мішені або послідовності-мішені включають, наприклад, тестування рівнів білка або РНК з використанням способів, відомих фахівцям у даній

області, таких як дот блот аналіз, Нозерн-блоттинг, *in situ* гібридизація, ELISA, імунопреципітація, ферментні функції, а також фенотипічні аналізи, відомі фахівцям у даній області.

[0061] Під "знижувати", "зниження", "зменшувати" або "зменшення" імунної відповіді за допомогою інтерферуючих РНК мають на увазі зниження виявляємої імунної відповіді, що дається на інтерферуючі РНК (наприклад, змінені інтерферуючі РНК) або інші терапевтичні агенти. Кількість зниження імунної відповіді за допомогою модифікованих інтерферуючих РНК може бути визначено по відношенню до рівня імунної відповіді у присутності немодифікованих інтерферуючих РНК. Зменшення, що виявляється, може бути близько 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% або нижчим, ніж імунна відповідь, що виявляється у присутності немодифікованих інтерферуючих РНК. Зниження імунної відповіді на інтерферуючі РНК, як правило, вимірюється за допомогою зниження продукування цитокінів (наприклад, IFN γ , IFN α , TNF α , IL-6, або IL-12) за допомогою клітини, що відповідає, *in vitro* або зменшенням продукування цитокінів у сироватці ссавця після введення інтерферуючих РНК.

[0062] Як використовується в цьому документі, термін "клітина, що відповідає" відноситься до клітини, бажано клітини ссавця, яка виробляє імунну відповідь, що детектується, при контакті з імуностимулюючою інтерферуючою РНК, такою як немодифікована міРНК. Приклади імунокомпетентних клітин містять, наприклад, дендритні клітини, макрофаги, моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC), спленоцити і тому подібне. Імунні реакції, що виявляються, включають, наприклад, продукування цитокінів або факторів зростання, таких як TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF, а також їх комбінації. Імунні реакції, що виявляються, також включають, наприклад, індукцію інтерферон-індукованого білка з тетрапептид повтором 1 (IFIT1) мРНК.

[0063] "В основному ідентична" відноситься до послідовності, яка гібридується з еталонною послідовністю в жорстких умовах або з послідовністю, яка має вказаний відсоток ідентичності до вказаної ділянки еталонної послідовності.

[0064] Термін "жорсткі умови гібридизації" відноситься до умов, при яких нуклеїнова кислота гібридується з цільовою послідовністю, як правило, у вигляді складної суміші нуклеїнових кислот, але без інших послідовностей. Жорсткі умови є послідовність-залежними і відрізнятимуться у різних обставинах. Довші послідовності гібридизуються, зокрема, при вищих температурах. Обширний посібник для гібридизації нуклеїнових кислот знаходиться у Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Як правило, жорсткі умови вибираються так, щоб бути близько 5-10°C нижче за точку плавлення (T_m) для конкретної послідовності при визначеній іонній силі pH. T_m є температурою (при визначеній іонній силі, pH і нуклеїновій концентрації), при якій 50% зондів, комплементарних до мішені, гібридизують з послідовністю-мішенню у рівновазі (оскільки послідовності-мішені присутні у надлишку, при T_m , 50% зондів зайнято у рівновазі). Жорсткі умови можуть бути також досягнуті з додаванням дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Для селективної або специфічної гібридизації, позитивний сигнал щонайменше у два рази, бажано у 10 разів більше початкової гібридизації.

[0065] Прикладні жорсткі умови гібридизації можуть бути наступними: 50% формаміду, 5xSSC, і 1% SDS, інкубації при 42°C, або, 5xSSC, 1% SDS, інкубації при 65°C, з промиванням у 0.2xSSC і 0,1% SDS при 65°C. Для PCR, при температурі близько 36°C, що характерно для ампліфікації низької жорсткості, хоча температура відпалу може варіюватися між близько 32°C і 48°C залежно від довжини праймера. Для високої жорсткості PCR-ампліфікації температура близько 62°C є типовою, хоча висока жорстка температура відпалу може знаходитися в діапазоні від близько 50°C до близько 65°C, залежно від довжини праймера і специфічності. Типові умови циклу для ампліфікації високої і низької жорсткості включають фазу денатурації 90°C-95°C протягом 30 сек.-2 хв., фазу відпалу тривалістю 30 сек.-2 хв., і фазу розширення близько 72°C протягом 1-2 хв. Протоколи і керуючі принципи для реакцій ампліфікації з низькою і високою жорсткістю передбачені, наприклад, в Innis et al., *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990).

[0066] Нуклеїнові кислоти, які не гібридизуються один з одним у жорстких умовах усе ще, по суті, ідентичні, якщо поліпептиди, які вони кодуєть, є по суті ідентичними. Це відбувається, наприклад, коли копію нуклеїнової кислоти створюють з використанням максимуму віродженого кодону, що допускається генетичним кодом. У таких випадках, нуклеїнові кислоти, як правило, гібридизуються у помірно жорстких умовах гібридизації. Приклади "помірно жорстких умов гібридизації" включають гібридизацію у буфері 40% формаміду, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C і промивання в 1X SSC при 45°C. Позитивна гібридизація щонайменше удвічі більше початкової.

Фахівці легко зрозуміють, що альтернативні умови гібридизації і відмивання можуть бути використані, щоб забезпечити умови аналогічної жорсткості. Додаткові керуючі принципи для визначення параметрів гібридизації надані у багаточисельних посиланнях, наприклад, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds.

[0067] Терміни "по суті ідентичні" або "в основному ідентичні", в контексті двох або більше нуклеїнових кислот, відносяться до двох або більше послідовностей або підпослідовностей, які однакові або мають певний відсоток нуклеотидів, які є однаковими (тобто, щонайменше близько 60%, бажано щонайменше близько 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% або 95% ідентичності у межах певної ділянки), при порівнянні і вірівнюванні для максимальної відповідності у рамці порівняння, або позначена область вимірюється за допомогою одного з наступних алгоритмів порівняння послідовностей або шляхом ручного вірівнювання і візуального огляду. Це визначення, коли контекст вказує, також аналогічно відноситься до комплементу послідовності. Бажано, значна ідентичність існує у ділянці, яка має щонайменше близько 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, або 60 нуклеотидів у довжину.

[0068] Для порівняння послідовностей, як правило, одна послідовність діє як еталонна послідовність, з якою порівнюють тестові послідовності. При використанні алгоритму порівняння послідовностей, тестована і еталонна послідовності вводяться у комп'ютер, позначають координати підпослідовності, за необхідності, і позначають параметри програми алгоритму послідовності. Можуть бути використані параметри програми за умовчанням, або можуть бути визначені альтернативні параметри. Потім алгоритм порівняння послідовностей розраховує відсоток збігу послідовностей для тестових послідовностей відносно еталонної послідовності, на основі параметрів програми.

[0069] "Рамка порівняння", як вона використана в цьому документі, містить посилання на сегмент будь-якого одного з ряду суміжних положень, вибраних з групи, що складається з близько від 5 до близько 60, зазвичай від близько 10 до близько 45, більш зазвичай від близько 15 до близько 30, в якому послідовність можна порівняти з еталонною послідовністю однієї і тієї ж кількості суміжних положень після того, як ці дві послідовності оптимально вірівняно. Способи вірівнювання послідовностей для порівняння, добре відомі у даній області техніки. Оптимальне вірівнювання послідовностей для порівняння може бути проведене, наприклад, за допомогою алгоритму локальної гомології Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), за допомогою алгоритму вірівнювання гомології Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), у способі пошуку подібності Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), з використанням комп'ютерних реалізацій цих алгоритмів (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), або ручним вірівнюванням і візуальним оглядом (см, наприклад, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (1995 supplement)).

[0070] Не обмежуючі приклади алгоритмів, які підходять для визначення відсотка ідентичності послідовності і схожості послідовностей, є алгоритми BLAST і BLAST 2.0, які описані в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997) та Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990), відповідно. BLAST і BLAST 2.0 використовуються з описаними у цьому документі параметрами, щоб визначити процентну ідентичність послідовностей для нуклеїнових кислот згідно винаходу. Програмне забезпечення для реалізації BLAST аналізів є загальнодоступним через Національний центр біотехнологічної інформації (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Іншим прикладом є алгоритм глобального вірівнювання для визначення відсотка ідентичності послідовності, такий як алгоритм Needleman-Wunsch для вірівнювання білкових або нуклеотидних (наприклад, РНК) послідовностей.

[0071] Алгоритм BLAST також виконує статистичний аналіз схожості між двома послідовностями (див., наприклад, Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787 (1993)). Одним з показників схожості за допомогою алгоритму BLAST є найменша сумарна вірогідність ($P(N)$), яка забезпечує індикацію вірогідності, з якою збіг між двома нуклеотидними послідовностями був би випадковим. Наприклад, нуклеїнова кислота вважається аналогічній еталонній послідовності, якщо найменша сумарна вірогідність при порівнянні тестової нуклеїнової кислоти з еталонною нуклеїновою кислотою менше, ніж близько 0,2, бажаніше менше ніж близько 0,01, і найбажаніше менше ніж близько 0,001.

[0072] Термін "нуклеїнова кислота", використаний у цьому документі, відноситься до полімеру, що містить щонайменше два дезоксирибонуклеотида або рибонуклеотида в будь-якій одноланцюжковій або дволанцюжковій формі і містить ДНК і РНК. ДНК може бути у формі, наприклад, антисмислових молекул, ДНК плазмід, заздалегідь конденсованої ДНК, PCR-продукта, векторів (P1, PAC, BAC, YAC, штучних хромосом), касет експресії, химерних послідовностей, хромосомної ДНК, або похідних і комбінації цих груп. РНК може бути у вигляді

тих, що малих інтерферують РНК (міРНК), Дайсер-субстратних дсРНК, невеликої шпильки РНК (ншРНК), асиметричних інтерферуючих РНК (аіРНК), мікроРНК (мікроРНК), мРНК, тРНК, рРНК, тРНК, вірусної РНК (вРНК), полівалентної РНК (ПВ РНК), а також їх комбінації. Нуклеїнові кислоти включають нуклеїнові кислоти, що містять відомі аналоги нуклеотидів або модифікованих залишків або зв'язків, які є синтетичними, такими, що зустрічаються у природі, не зустрічаються в природі, і які мають схожі властивості зв'язування як еталонної нуклеїнової кислоти. Приклади таких аналогів містять, без обмеження, фосфоротіоати, фосфорамідати, метил-фосфонати, хіральні метил-фосфонати, 2'-О-метил рибонуклеотиди, і пептид-нуклеїнові кислоти (ПНК). Без спеціального обмеження, термін охоплює нуклеїнові кислоти, що містять відомі аналоги природних нуклеотидів, які мають аналогічні властивості зв'язування як еталонної нуклеїнової кислоти. Якщо не вказане інше, конкретна послідовність нуклеїнової кислоти також побічно охоплює її консервативно модифіковані варіанти (наприклад, заміни віроджених кодонів), алелі, ортологи, SNP і комплементарні послідовності, а також послідовності, вказані в явному вигляді. Зокрема, заміни віроджених кодонів можуть бути досягнуті шляхом створення послідовності, в якій третє положення одного або більше вибраних (або всіх) кодонів заміщено змішано-основним та/або дезоксиінозиновими залишками (Batzer et al., Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)). "Нуклеотиди" містять цукри дезоксирибози (ДНК) або рибози (РНК), основу, і фосфатну групу. Нуклеотиди зв'язані один з одним через фосфатні групи. "Основи" містять пурини і піримідини, які додатково містять природні сполуки аденін, тимін, гуанін, цитозин, урацил, інозин, і природні аналоги і синтетичні похідні пуринів і піримідинів, які містять модифікації, але не обмежуються ними, які мають нові реакційноспроможні групи, такі як аміни, спирти, тіоли, карбоксилати і алкілгалогеніди, але не обмежуючись ними.

[0073] Термін «ген» відноситься до послідовності нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК або РНК), яка містить часткову довжину або цілі довжини послідовностей кодування, необхідні для одержання поліпептиду або попередника поліпептиду.

[0074] "Генний продукт", як він використаний у цьому документі, відноситься до продукту гена, такого як РНК-транскрипт або поліпептид.

[0075] Термін "ліпід" відноситься до групи органічних сполук, які охоплюють складні ефіри жирних кислот, але не обмежуються ними, і характеризується тим, що нерозчинні у воді, але розчинні у багатьох органічних розчинниках. Вони, як правило, поділяються щонайменше на три класи: (1) "прості ліпіди", які включають жири і масла, а також віски; (2) "складні ліпіди", які містять фосфоліпіди і гліколіпіди; і (3) "похідні ліпіди", такі як стероїди.

[0076] Термін "ліпідна частка" охоплює ліпідний препарат, який може бути використаний для доставки активного агента або терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК), у той сайт-мішень, що цікавить (наприклад, клітину, тканину, орган і тому подібне). У бажаних варіантах реалізації ліпідна частка за цим винаходом є ліпідною наночасткою, яка, як правило, формується з катіонного ліпіду, некатіонного ліпіду, і, необов'язково, кон'югованого ліпіду, який запобігає агрегації часток. У інших бажаних варіантах реалізації, які можуть бути віднесені до "нуклеїнових кислотно-ліпідних часток", активний агент або терапевтичний засіб, наприклад нуклеїнова кислота, можуть бути інкапсульовані в ліпідну частину частки, тим самим захищаючи її від ферментативного розщеплювання.

[0077] Як використовується у цьому документі, термін "LNP" відноситься до ліпідної наночастки. LNP є часткою, виготовленою з ліпідів (наприклад, катіонний ліпід, некатіонний ліпід, і, необов'язково, кон'югований ліпід, що запобігає агрегації часток), де нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК) повністю інкапсульюється у ліпід. У деяких випадках, LNP надзвичайно корисні для системних застосувань, оскільки вони можуть мати розширений життєвий цикл після внутрішньовенної (в.в.) ін'єкції, вони можуть накопичуватися в дистальних ділянках (наприклад, фізично відокремлених сайтах від сайту введення), і вони можуть опосередкувати виключення експресії цільових генів у цих дистальних сайтах. Нуклеїнова кислота може бути у вигляді комплексу з конденсуючим агентом і інкапсульованими усередині LNP, як викладено у публікації PCT WO 00/03683, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0078] Ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) зазвичай мають середній діаметр від близько 30 нм до близько 150 нм, від близько 40 нм до близько 150 нм, від близько 50 нм до близько 150 нм, від близько 60 нм до близько 130 нм, від близько 70 нм до близько 110 нм, від близько 70 нм до близько 100 нм, від близько 80 нм до близько 100 нм, від близько 90 нм до близько 100 нм, від близько 70 до близько 90 нм, від близько 80 нм до близько 90 нм, від близько 70 нм до близько 80 нм, або близько 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65

нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм, або 150 нм, і по суті не токсичні. Крім того, нуклеїнові кислоти, якщо вони присутні в ліпідних частках за цим винаходом, є стійкими у водному розчині до деградації з нуклеазою. Ліпідні наночастки і спосіб їх одержання описані, наприклад, у публікації заявки на патент США № 2004/0142025 і 2007/0042031, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0079] У цьому описі, "інкапсульований ліпід" може відноситися до ліпідної частки, яка забезпечує активний агент або терапевтичний засіб, такий як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК), з повною герметизацією, частковою герметизацією, або обома. У бажаному варіанті реалізації нуклеїнова кислота повністю поміщена в ліпідну частку (наприклад, з утворенням LNP).

[0080] Термін "ліпідний кон'югат" відноситься до кон'югованого ліпиду, який інгібує агрегацію часток ліпідів. Такі ліпідні кон'югати охоплюють PEG-кон'югати ліпідів, таких як, наприклад, PEG сполучені з діалкілоксипропілами (наприклад, PEG-кон'югат и DAA), PEG сполучений з діацилгліцеринами (наприклад, PEG -кон'югатів DAG), PEG сполучені з холестериним, пов'язані з PEG фосфатидилетаноламіни, і PEG, кон'юговані з керамідами (див., наприклад, патент США № 5885613), катіонні ліпіди PEG, поліоксазолінові (POZ)-ліпідні кон'югати, поліамідні олігомери (наприклад, АТТА-ліпідні кон'югати) і їх суміші, але не обмежуються ними. Додаткові приклади POZ-ліпідних кон'югатів описані в РСТ публікації WO 2010/006282. PEG або POZ можуть бути кон'юговані безпосередньо з ліпідом або можуть бути пов'язані з ліпідами за допомогою лінкерної частини молекули. Може бути використаний будь-який зв'язуючий фрагмент, призначений для поєднання PEG або POZ з ліпідом, у тому числі, наприклад, лінкерні фрагменти, що не містять ефір і лінкерні фрагменти, що містять ефір. У деяких бажаних варіантах реалізації використовуються ті лінкерні фрагменти, що не містять ефір, такі як аміди або карбамати. Розкриття кожного з вказаних вище патентних документів включені у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0081] Термін "амфіпатичні ліпіди" відноситься, зокрема, до будь-якого відповідного матеріалу, який відрізняється тим, що гідрофобна частина ліпідного матеріалу орієнтована в гідрофобній фазі, тоді як гідрофільна частина орієнтована у напрямку до водної фази. Гідрофільні характеристики витікають з присутності полярних або заряджених груп, таких як вуглеводних, фосфатних, карбонових, сульфатних, аміно, сульфгідрильних, нітро, гідроксильних, і інших подібних груп. Гідрофобність може бути досягнута за рахунок включення неполярних груп, які охоплюють довголанцюжкові, насичені і ненасичені аліфатичні вуглеводневі групи, і такі групи, заміщені однією або більше ароматичною, циклоаліфатичною або гетероциклічною групою (ами), але не обмежуються ними. Приклади амфіпатичних сполук охоплюють фосфоліпіди, аміноліпіди і сфінголіпіди, але не обмежуються ними.

[0082] Типові приклади фосфоліпідів охоплюють фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозитол, фосфатидну кислоту, фосфатидилхолін, пальмітоїлолеоїл лізофосфатидилхолін, лізофосфатидилетаноламін, дипальмітоїлфосфатидилхолін, дистеароїлфосфатидилхолін, діолеоїлфосфатидилхолін, і дилінолеоїлфосфатидилхолін, але не обмежуються ними. Інші сполуки, без фосфору, такі як сфінголіпіди, сімейство глікосфінголіпідів, діацилгліцерини і β -ацилокси кислоти, також знаходяться в групі, що визначається як амфіпатичні ліпіди. Крім того, амфіпатичні ліпіди, описані вище, можуть бути змішані з іншими ліпідами, у тому числі тригліцериди і стерини.

[0083] Термін "нейтральний ліпід" відноситься до будь-якого з декількох видів ліпідів, які існують або в незарядженій, або в нейтральній цвіттер-іонній формі при вибраному значенні рН. При фізіологічному значенні рН, такі ліпіди охоплюють, наприклад, діацилфосфатидилхолін, діацилфосфатидилетаноламін, керамід, сфінгомиелін, цефалін, холестерин, цереброзиди і діацилгліцерини.

[0084] Термін "некатіонний ліпід" відноситься до будь-якого амфіпатичного ліпиду, а також будь-якого іншого нейтрального ліпиду або аніонного ліпиду.

[0085] Термін "аніонний ліпід" відноситься до будь-якого ліпиду, який негативно заряджений при фізіологічному значенні рН. Ці ліпіди охоплюють фосфатидилгліцерини, кардіоліпіни, діацилфосфатидилсерини, діацилфосфорну кислоту, N-додеканоїл фосфатидилетаноламіни, N-сукциніл фосфатидилетаноламіни, N-глутарилдіацилфосфатидилетаноламін, лізилфосфатидилгліцероли, пальмітоїлолеоїлфосфатидилгліцерол (POPG), і інші аніонні модифікації груп, поєднаних у нейтральні ліпіди, але не обмежуються ними.

[0086] Термін "гідрофобний ліпід" відноситься до сполук, що мають неполярні групи, які охоплюють довголанцюжкові насичені і ненасичені аліфатичні вуглеводневі групи і такі групи, необов'язково заміщені однією або декількома ароматичними, циклоаліфатичними або

гетероциклічними групами, але не обмежуються ними. Прийнятні приклади охоплюють діацилгліцерин, діалкілгліцерол, N,N-діалкіламін, 1,2-діацилокси-3-амінопропан і 1,2-діалкіл-3-амінопропан, але не обмежуються ними.

5 [0087] Термін "злиті" відноситься до здатності ліпідної частки, такої як LNP, зливатися з мембранами клітини. Мембрани можуть бути або плазматичними мембранами або мембранами, що оточують органели, наприклад, ядерце, ядро, і так далі.

[0088] Як використовується у цьому документі, термін "водний розчин" відноситься до композиції, що містить у цілому або частково, воду.

10 [0089] Як використано у даному описі, термін "органічний розчин ліпідів" відноситься до композиції, що містить у цілому або частково, органічний розчинник, що містить ліпід.

[0090] "Дистальний сайт", як він використаний у цьому документі, відноситься до фізично окремого місця, яке не відокремлене від капілярного русла, але охоплює ділянки, широко розподілені по всьому організму.

15 [0091] "Сироватка-стабільний" по відношенню до нуклеїнової кислот-ліпідної частки, такої як LNP, позначає, що частка неістотно деградувала після дії сироватки або нуклеази, що істотно руйнує вільну ДНК або РНК. Прийнятні аналізи охоплюють, наприклад, стандартний сироватковий аналіз, аналіз ДНКаз, або аналіз РНКаз.

20 [0092] "Системна доставка", як вона використана у цьому документі, відноситься до доставки ліпідних часток, що призводить до широкого біорозподілу активного агента, такого як інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК) в організмі. Деякі способи введення можуть привести до системної доставки певних агентів, але не інших. Системна доставка позначає, що корисна, бажана терапевтична кількість лікарського засобу, піддає дії більшу частину тіла. Щоб отримати широкий біорозподіл, зазвичай потрібний такий час життя у крові, щоб агент не швидко деградував або очищувався (наприклад, за допомогою пресистемних органів (печінки, легенів і так далі) або швидкого, неспецифічного зв'язування клітинами) до досягнення сайту хвороби, дистального до сайту введення. Системна доставка ліпідних часток може здійснюватись за будь-яким способом, відомим у даній області, у тому числі, наприклад, внутрішньовенно, підшкірно і внутрішньочеревно. У бажаному варіанті реалізації, системна доставка ліпідних часток є внутрішньовенною доставкою.

30 [0093] "Локальна доставка", як використовується у цьому документі, відноситься до доставки активного агента, такого як інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК) безпосередньо у сайт-мішень в організмі. Наприклад, агент може бути доставлений на місце шляхом прямої ін'єкції у місце захворювання, такого як пухлина або іншого сайту-мішені, такого як ділянка запалення або органу-мішені, такого як печінка, серце, нирки, підшлункова залоза і тому подібне.

35 [0094] Термін "ссавець" відноситься до будь-якого виду ссавців, такому як людина, миші, щури, собаки, кішка, хом'як, морська свинка, кролик, худоба і тому подібне.

40 [0095] Термін "рак" відноситься до будь-якого члена класу захворювань, що характеризуються неконтрольованим зростанням аберантних клітин. Цей термін включає всі відомі види раку і пухлинних станів, чи вони охарактеризовані як злоякісні, доброякісні, м'яких тканин, або твердих, і раку на всіх етапах і мірах, у тому числі до і після метастатичних ракових утворень. Приклади різних видів раку охоплюють рак печінки, рак легенів, рак товстої кишки, рак прямої кишки, анальний рак, рак жовчних проток, рак малого кишечника, рак шлунку (гастроскопічний), рак стравоходу; рак жовчного міхура, рак підшлункової залози, рак апендикса, рак молочної залози, рак яєчників; рак шийки матки, рак передміхурової залози, рак нирки (наприклад, нирково-клітинний рак), рак центральної нервової системи, гліобластоми, рак шкіри, лімфому, хоріокарциному, раки голови і шиї, остеогенні саркоми, рак крові, але не обмежуються ними. Необмежуючі приклади конкретних типів раки печінки включають гепатоцелюлярну карциному (HCC), вторинний рак печінки (наприклад, викликаний метастазами деяких інших ракових клітин непечінкового типу), і гепатобластоми. Як використано у цьому документі, "пухлина" містить одну або більше ракових клітин.

50 [0096] Термін "полівалентні РНК", скорочено "ПВ РНК", відноситься до полінуклеотидного комплексу, що складається як мінімум з трьох полінуклеотидів, в якому кожен полінуклеотид гібридизують по всій довжині або по його частині, до щонайменше двох інших полінуклеотидів комплексу і які відрізняються тим, що один або більше полінуклеотидів необов'язково містить область-мішень, яка здатна до гібридизації з послідовністю нуклеїнової кислоти. Кожен полінуклеотид може мати, наприклад, від 10 до 60 нуклеотидів у довжину. Область-мішень(і) в полінуклеотиді можуть бути здатна до гібридизації з послідовністю-мішенню нуклеїнової кислоти, яка є однаковою або відмінною, від послідовності(ей) нуклеїнової кислоти-мішені, з яким область-мішень(і) інших полінуклеотидів комплексу гібридизує. Багатовалентні РНК можуть бути синтезовані *in vitro* (наприклад, шляхом хімічного синтезу) або, наприклад, вони

можуть бути отримані з попередника у живій клітині. Наприклад, попередник може бути лінійним полінуклеотидом, який містить кожен з полінуклеотидів багатовалентних РНК, які вводять в живу клітину, і розщеплюється в ній з утворенням багатовалентних РНК. Термін "полівалентні РНК" охоплює такого попередника, який призначений для того, щоб бути розщепленим усередині живої клітини. Термін "полівалентні РНК" також охоплює, як приклад, трибичні полінуклеотидні комплекси, описані, зокрема або, загалом, в опублікованій міжнародній патентній заявці, що має номер міжнародної заявки PCT/US2010 /036962.

III. Нові катіонні ліпіди

[0097] Цей винахід передбачає, зокрема, нові катіонні (аміно) ліпіди, які можуть бути переважно використані в ліпідних частках, описаних у цьому документі, для *in vitro* та/або *in vivo* доставок терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти, в клітини. Нові катіонні ліпіди згідно винаходу мають структури за формулою I, викладені у цьому документі, і містять їх (R) та/або (S) енантіомери.

[0098] У деяких варіантах реалізації ліпід, згідно цьому винаходу, містить рацемічну суміш. У інших варіантах реалізації ліпід, за цим винаходом, включає суміш одного або більше діастереомерів. У деяких варіантах реалізації ліпід, за цим винаходом, збагачений одним енантіомером, таким чином, щоб ліпід містив щонайменше близько 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, або 95% енантіомерного надлишку. У деяких інших варіантах реалізації ліпід, за цим винаходом, збагачений одним діастереомером, таким чином, щоб ліпід містив щонайменше близько 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, або 95% діастереомерного надлишку. У деяких додаткових варіантах реалізації ліпід, за цим винаходом, є хіралью чистим (наприклад, містить один оптичний ізомер). У інших варіантах реалізації ліпід, за цим винаходом, збагачений одним оптичним ізомером (наприклад, оптично активним ізомером), таким чином, щоб ліпід містив щонайменше близько 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% або 95% надлишку ізомерів. Цей винахід забезпечує синтез катіонних ліпідів за формулою I у вигляді рацемічної суміші або в оптично чистій формі.

[0099] Терміни "катіонний ліпід" і "аміно ліпід" використовуються в цьому документі взаємозамінно і охоплюють ті ліпіди і солі, наприклад, фармацевтично прийнятні солі, які мають одну, дві, три або більше жирних кислот або жирних алкільних ланцюгів і рН-титруємі амінокислотні кінцеві групи (наприклад, алкіламіно або діалкіламіно кінцеву групу). Катіонний ліпід, як правило, протонований (тобто позитивно заряджений) при рН нижче pK_a катіонного ліпиду і по суті нейтральний при рН вище pK_a . Катіонні ліпіди згідно винаходу також можуть бути названі титруєними катіонними ліпідами.

[0100] Термін "солі" охоплює будь-який аніонний і катіонний комплекс, такий як комплекс, утворений між катіонним ліпідом, описаним у цьому документі, і одним або більше аніоном. Необмежуючі приклади аніонів охоплюють неорганічні і органічні аніони, наприклад, гідрид, фторид, хлорид, бромід, йодид, оксалат (наприклад, гемиоксалат), фосфат, фосфонат, гідрофосфат, дигідрофосфат, оксид, карбонат, бікарбонат, нітрат, нітрит, нітрид, бісульфіт, сульфід, сульфат, бісульфат, сульфат, тіосульфат, гідросульфат, борат, форміат, ацетат, бензоат, цитрат, тартрат, лактат, акрилат, поліакрилат, фумарат, малеат, ітаконат, гліколят, глюконат, малат, манделат, тиглат, аскорбінова кислота, саліцилат, поліметакрилат, перхлорат, хлорат, хлорит, гіпохлорит, бромат, гіпобромід, йодат, алкілсульфонат, арилсульфонат, арсенат, арсеніт, хромат, біхромат, ціанід, ціанат, тіоціанат, гідроксид, пероксид, перманганат і їх суміші. У конкретних варіантах реалізації, солі катіонних ліпідів, описаних у цьому документі, є кристалічними солями. У конкретних варіантах реалізації, "солі" є "фармацевтично прийнятними солями".

[0101] Термін "фармацевтично прийнятні солі" відноситься до фармацевтично прийнятних солей сполук, солі яких, отримані з різних органічних і неорганічних протиіонів, добре відомі у даній області техніки. Фармацевтично прийнятні солі охоплюють як металеві (неорганічні) так і органічні солі, у тому числі перераховані в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, pg. 1418 (1985), але не обмежуючись ними. Фармацевтично прийнятні солі охоплюють, як приклад, солі неорганічних кислот, такі як гідрохлорид, сульфат, фосфат, дифосфат, гідробромід і нітрат, або солі органічних кислот, такі як малат, малеат, фумарат, тартрат, сукцинат, цитрат, ацетат, лактат, метансульфонат, п-толуолсульфонат або пальмоат, саліцилат і стеарат. Аналогічно фармацевтично прийнятні катіони охоплюють натрій, калій, кальцій, алюміній, літій і амоній (особливо амонієві солі з вторинними амінами), але не обмежуються ними. Конкретні солі за даним винаходом за причинами, вказаними вище, охоплюють калій, натрій, кальцій і амонієві солі.

[0102] Термін "алкіл" охоплює прямий або розгалужений ланцюг, нециклічний або циклічний, насичений аліфатичний вуглеводень, що містить від 1 до 24 атомів вуглецю. Типові насичені

алкіли з прямим ланцюгом охоплюють метил, етил, н-пропіл, н-бутил, н-пентил, н-гексил, і подібні до них, але не обмежуються ними, тоді як насичені розгалужені алкіли охоплюють ізопропіл, втор-бутил, ізобутил, трет-бутил, ізопентил і тому подібне, але не обмежуються ними. Типові насичені циклічні алкіли охоплюють C_{3-8} циклоалкіли, але не обмежуються ними, описані у цьому документі, тоді як ненасичені циклічні алкіли охоплюють C_{3-8} циклоалкеніли, описані у цьому документі, але не обмежуються ними.

[0103] Термін "гетероалкіл" охоплює лінійний або розгалужений ланцюг, нециклічний, або циклічний, насичений аліфатичний вуглеводень, як визначено вище, що містить від близько 1 до близько 5 гетероатомів (тобто 1, 2, 3, 4 або 5 гетероатомів), таких як, наприклад, O, N, Si і S, де атоми азоту і сірки можуть бути окиснені, і гетероатом азоту може бути, необов'язково, кватернізованим. Гетероалкільна група може бути приєднана до останньої частини молекули через атом вуглецю або гетероатом.

[0104] Термін "циклічний алкіл" охоплює будь-який заміщений або незаміщений циклоалкіл, гетероциклоалкіл, циклоалкеніл, гетероциклоалкеніл і групи, описані нижче.

[0105] Термін "циклоалкіл" охоплює заміщену або незаміщену циклічну алкільну групу, що має від близько 3 до близько 8 атомів вуглецю (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 атомів вуглецю) як верхнє кільце. Бажані циклоалкільні групи охоплюють групи, що мають від близько 3 до близько 6 атомів вуглецю у верхньому кільці. Приклади C_{3-8} циклоалкільних груп охоплюють циклопропіл, метил-циклопропіл, диметил-циклопропіл, циклобутил, метил-циклобутил, циклопентил, метил-циклопентил, циклогексил, метил-циклогексил, диметил-циклогексил, циклогептил і циклооктил, а також інші заміщені C_{3-8} циклоалкільні групи, але не обмежуються ними.

[0106] Термін "гетероциклоалкіл" охоплює заміщену або незаміщену циклічну алкільну групу, як визначено вище, що містить від близько 1 до близько 3 гетероатомів як членів кільця, вибраних з групи, що складається з O, N, Si і S, в якому атоми азоту і сірки необов'язково можуть бути окиснені, і гетероатом азоту може бути кватернізований. Гетероциклоалкільна група може бути приєднана до останньої частини молекули через атом вуглецю або гетероатом.

[0107] Термін "циклоалкеніл" охоплює заміщену або незаміщену циклічну алкенільну групу, що містить від близько 3 до близько 8 атомів вуглецю (наприклад, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 атомів вуглецю) як верхнє кільце. Бажаними є циклоалкенільні групи, що мають від близько 3 до близько 6 атомів вуглецю у верхньому кільці. Приклади C_{3-8} циклоалкенільних груп охоплюють циклопропеніл, метил-циклопропеніл, диметил-циклопропеніл, циклобутеніл, циклопентеніл, циклогексеніл, циклогептеніл, циклооктеніл і так же як інші заміщені C_{3-8} циклоалкенільні групи.

[0108] Термін "гетероциклоалкеніл" охоплює заміщену або незаміщену циклічну алкенільну групу, як визначено вище, що містить від близько 1 до близько 3 гетероатомів як членів кільця, вибраних з групи, що складається з O, N, Si і S, де атом азоту і сірки атоми необов'язково можуть бути окиснені, і гетероатом азоту може бути кватернізований. Гетероциклоалкенільна група може бути приєднана до останньої частини молекули через атом вуглецю або гетероатом.

[0109] Термін "алкокси" охоплює групу за формулою алкіл-O-, в якій, "алкіл" має раніше вказане визначення. Необмежуючі приклади алкоксигруп включають метокси, етокси, н-пропокси, ізопропокси, н-бутокси, ізо-бутокси, втор-бутокси і трет-бутокси.

[0110] Термін "алкеніл" охоплює алкіл, як визначено вище, що містить, щонайменше, один подвійний зв'язок між сусідніми атомами вуглецю. Алкеніли охоплюють як цис, так і трансизомери. Представлені прямим і розгалуженими ланцюгами алкеніли охоплюють етиленіл, пропіленіл, 1-бутеніл, 2-бутеніл, ізобутеніл, 1-пентеніл, 2-пентеніл, 3-метил-1-бутеніл, 2-метил-2-бутеніл, 2,3-диметил-2-бутеніл і тому подібне, але не обмежуються ними. Типові циклічні алкеніли описані вище.

[0111] Термін "алкініл" охоплює будь-який алкіл або алкеніл, як визначено вище, який додатково містить щонайменше один потрійний зв'язок між сусідніми атомами вуглецю. Представники прямого і розгалуженого ланцюга, алкініли охоплюють, без обмеження, ацетиленіл, пропініл, 1-бутиніл, 2-бутиніл, 1-пентиніл, 2-пентиніл, 3-метил-1-бутиніл і тому подібне.

[0112] Термін "арил" охоплює зазвичай поліненасичену ароматичну вуглеводневу групу, яка може бути одним кільцем або декількома кільцями (до трьох кілець), які з'єднуються разом, або зв'язані ковалентно, і які необов'язково несуть один або більше замісників, таких як, наприклад, галоген, трифторметил, аміно, алкіл, алкокси, алкілкарбоніл, ціано, карбамоїл, алкоксикарбамоїл, метилендіокси, карбокси, алкоксикарбоніл, амінокарбоніл, алкіламінокарбоніл, діалкіламінокарбоніл, гідроксі, нітро і тому подібне. Необмежуючі приклади

незаміщених арильних груп охоплюють феніл, нафтил і біфеніл. Приклади заміщених арильних груп охоплюють феніл, хлорфеніл, трифторметилфеніл, хлорфторфеніл, і амінофеніл, але не обмежуються ними.

[0113] Терміни "алкілтіо", "алкілсульфоніл", "алкілсульфініл" і "арилсульфоніл" охоплюють групи, що мають формулу $-S-R^i$, $-S(O)_2-R^i$, $-S(O)-R^i$ і $-S(O)_2R^i$, відповідно, де R^i є алкільною групою, як визначено вище, і R^i позначає арильну групу, як визначено раніше.

[0114] Терміни "алкенілокси" і "алкінілокси" охоплюють групи, що мають формулу $-O-R^i$, в якій R^i є алкенільною або алкінільною групою, відповідно.

[0115] Терміни "алкенілтїо" і "алкінілтїо" охоплюють групи, що мають формулу $-S-R^k$, де R^k є алкенілом або алкінілом, відповідно.

[0116] Термін "алкоксикарбоніл" охоплює групу, що має формулу $-C(O)O-R^i$, де R^i є алкільною групою, як визначено вище, і в якій загальне число атомів вуглецю відноситься до об'єднаних алкільних і карбонільних фрагментів.

[0117] Термін "ацил" охоплює будь-який алкіл, алкеніл або алкініл, де вуглець в точці приєднання заміщений оксогрупою, як визначено нижче. Нижче наведені необмежуючі приклади ацильних груп: $-C(=O)$ алкіл, $-C(=O)$ алкеніл, і $-C(=O)$ алкініл.

[0118] Термін "гетероцикл" охоплює 5-7-членне моноциклічне, або 7-10-членне біциклічне гетероциклічне кільце, яке є або насиченим, або ненасиченим, або ароматичним і яке містить 1 або 2 гетероатомів, незалежно вибраних з азоту, кисню і сірки, і де гетероатоми азоту і сірки можуть бути, необов'язково, окислені, а гетероатом азоту може бути, необов'язково, кватернізований, у тому числі біциклічним кільцем, в якому будь-який з вказаних вище гетероциклів злитий з бензоловим кільцем. Гетероцикл може бути приєднаний через будь-який гетероатом або атом вуглецю. Гетероцикли охоплюють гетероарили, як визначено вище, а також морфолініл, піролідіноніл, піролідиніл, піперидиніл, піперизиніл, гідантоїніл, валеролактаміл, оксираніл, оксетаніл, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, тетрагідропіридиніл, тетрагідротіофеніл, тетрагідропримидиніл, тетрагідротіопіраніл, тетрагідропіримідиніл, тетрагідротіофеніл, тетрагідротіопіраніл і тому подібне, але не обмежуються ними.

[0119] Термін "гетероарил" охоплює ароматичний 5-10-членний гетероцикл, який містить один, два або більше гетероатомів, вибраних з азоту (N), кисню (O) і сірки (S). Гетероарил може бути заміщений по одному або більше атомам вуглецю замісниками, такими як, наприклад, галоген, алкіл, алкокси, ціано, галогеналкіл (наприклад, трифторметил), гетероцикліл (наприклад, морфолініл або піролідініл), і тому подібне. Необмежуючі приклади гетероарилів охоплюють піридиніл і фураніл.

[0120] Термін "галоген" охоплює фтор, хлор, бром і йод.

[0121] Терміни "необов'язково заміщений алкіл", "необов'язково заміщений циклічний алкіл", "необов'язково заміщений алкеніл", "необов'язково заміщений алкініл", "необов'язково заміщений ацил" і "необов'язково заміщений гетероцикл" позначають, що щонайменше один атом водню заміщений замісником. У разі "оксо" замісника ($=O$), два атоми водню є заміщеними. Необмежуючі приклади замісників охоплюють галоген, оксо, гетероцикл, $-CN$, $-OR^x$, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$, і $-SO_nNR^xR^y$, де n дорівнює 0, 1, or 2, R^x і R^y можуть бути однаковими або різними і незалежно представленими воднем, алкілом або гетероциклом, кожен з алкільних і гетероциклічних замісників можуть бути додатково заміщені одним або більше з оксо, галогену, $-OH$, $-CN$, алкілу, $-OR^x$, гетероциклу, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$, і $-SO_nNR^xR^y$. Термін "необов'язково заміщений", коли використовується перед списком замісників, означає, що кожен із замісників у списку може бути необов'язково заміщений, як описано у цьому документі.

[0122] В одному з аспектів цей винахід відноситься до катіонних ліпідів, що мають структурну формулу (I):

X-A-Y-Z; (I)

або їх солям, де:

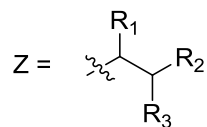
X є алкіламіногрупою;

A є від C_1 до C_6 необов'язково заміщеним алкілом, де вказаний необов'язково заміщений C_1 - C_6 -алкіл може бути насиченим або ненасиченим, і де A може бути присутнім або може не бути присутнім;

Y вибраний з групи, що складається з кеталу, складного ефіру, необов'язково заміщеного карбамата, ефіру, і необов'язково заміщеного аміда; і

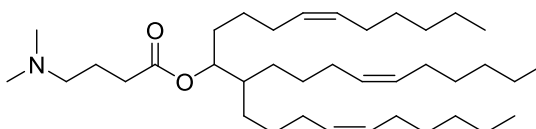
Z є гідрофобним фрагментом, що складається з трьох алкільних ланцюгів, де кожен з алкільних ланцюгів має довжину від C_8 до C_{11} , де кожен з трьох алкільних ланцюгів може бути насиченим або ненасиченим, і де кожен з трьох алкільних ланцюгів є необов'язково заміщеним.

[0123] У деяких варіантах реалізації ліпідів за Формулою (I), Z має формулу:

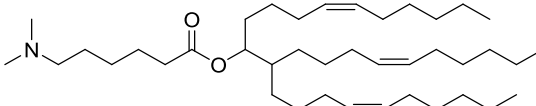


де, R_1 , R_2 , і R_3 , кожен окремо, вибрані з групи, що складається з від C_8 до C_{11} алкіла, де кожен з R_1 , R_2 , і R_3 може незалежно бути заміщеним або незаміщеним, і де кожен з R_1 , R_2 , і R_3 є необов'язково заміщеним.

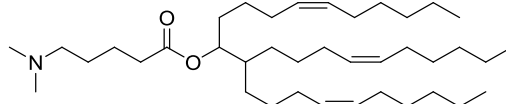
[0124] У конкретних варіантах реалізації, ліпід за Формулою (I) має одну з наступних структур:



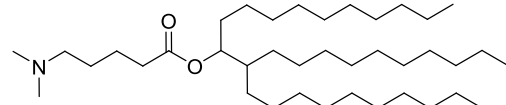
Сполука 9,



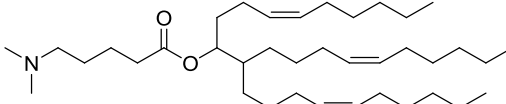
Сполука 11,



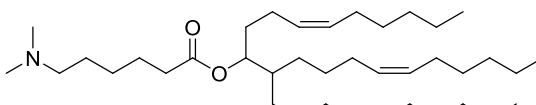
Сполука 13,



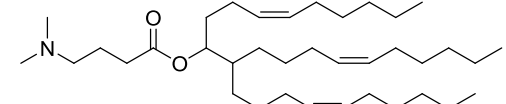
Сполука 14,



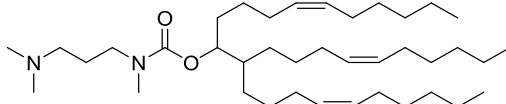
Сполука 19,



Сполука 21,



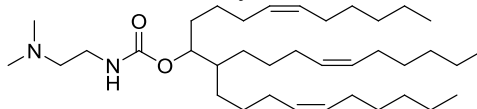
Сполука 22,



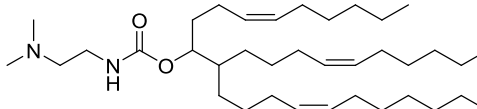
Сполука 23,

5

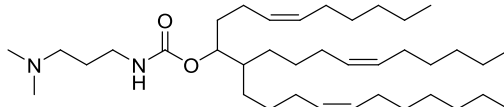
Сполука 24,



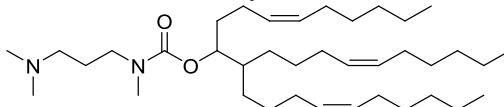
Сполука 25,



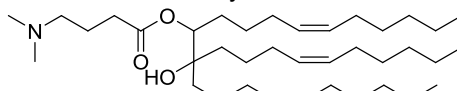
Сполука 26,



Сполука 27,

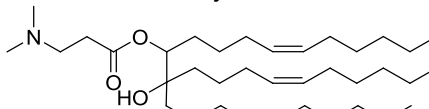


Сполука 28,

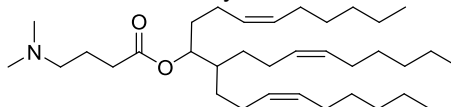


10

Сполука 30,

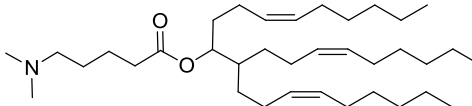


Сполука 31,

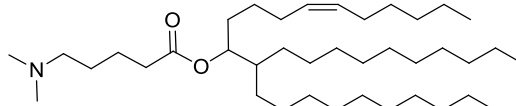


15

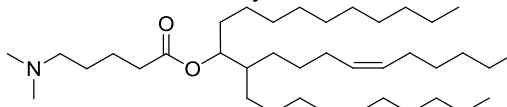
Сполука 40,



Сполука 42,

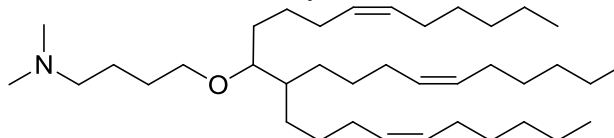


Сполука 50,

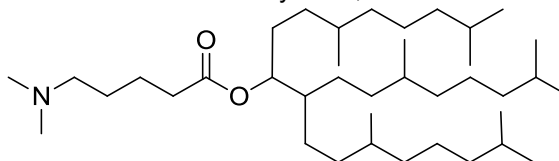


20

Сполука 53,

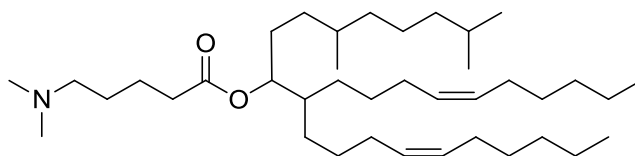


Сполука 62,

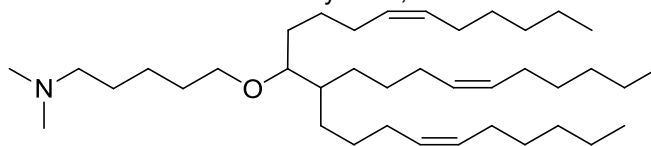


25

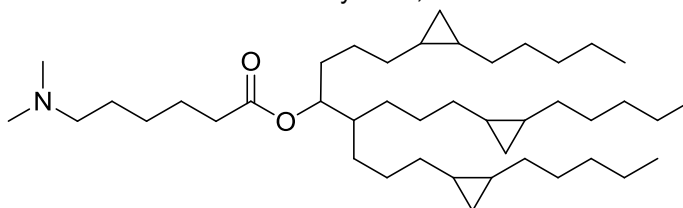
Сполука 71,



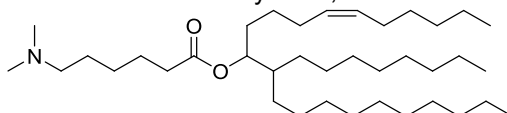
Сполука 74,



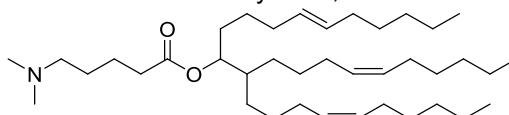
Сполука 76,



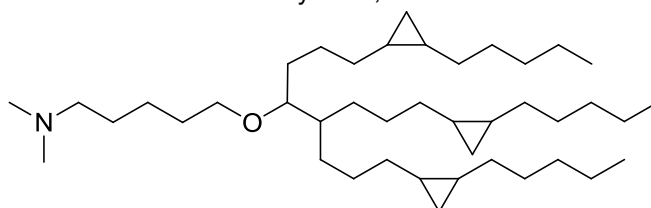
Сполука 79,



Сполука 83,



Сполука 89, або



Сполука 90.

[0125] У деяких варіантах реалізації цього винаходу катіонний ліпід утворює сіль (наприклад, кристалічну сіль) з одним або більше аніоном. У одному конкретному варіанті реалізації катіонний ліпід є оксалатом (наприклад, геміоксалатом) солі, який бажано є кристалічною сіллю. У конкретних варіантах реалізації катіонний ліпід утворює фармацевтично прийнятну сіль з одним або більше аніоном.

[0126] Також включеними в обсяг цього винаходу є кристалічні форми, гідрати і сольвати сполук, описаних у цьому документі.

[0127] Сполуки за винаходом можуть бути отримані за допомогою відомих органічних способів синтезу, у тому числі за способами, описаних у прикладах. У деяких варіантах реалізації синтез катіонних ліпідів за винаходом може вимагати використання захисних груп. Методологія захисних груп добре відома фахівцям у даній області (дивись, наприклад, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Якщо коротко, то захисні групи у контексті цього винаходу є будь-якою групою, яка зменшує або усуває небажану реакційну здатність функціональної групи. Захисна група може бути додана до функціональної групи для того, щоб замаскувати її реакційну здатність у ході деяких реакцій, а потім видалена для того, щоб показати первинну функціональну групу. В деяких випадках використовується "спиртова захисна група". "Спиртова захисна група" означає будь-яку групу, яка зменшує або усуває небажану реактивність функціональної спиртової групи. Захисні групи можуть бути додані і видалені за допомогою способів, добре відомих у даній області техніки.

[0128] У деяких варіантах реалізації катіонні ліпіди за цим винаходом мають щонайменше одну протонуєму або депротонуєму групу, таку, що ліпід позитивно заряджений при рН на рівні або нижче за фізіологічне значення рН (наприклад, рН 7,4), і нейтральний на другому рН,

бажано на рівні або вище фізіологічного pH. Має бути зрозуміло будь-якому фахівцеві у даній області техніки, що додавання або видалення протонів залежить від pH рівноважного процесу, і, що посилення на заряджений або нейтральний ліпід відноситься до характеру переважаючого виду і не вимагає, щоб усі ліпіди були присутні у зарядженій або нейтральній формі. Ліпіди, які

мають більше однієї протонуємої або депротонуємої групи, або які є цвіттер-іонами, не виключаються з використання у цьому винаході.

[0129] У деяких інших варіантах реалізації, протонуємі ліпіди, відповідно до винаходу мають pK_a протонуємих груп у діапазоні від близько 4 до близько 11. Найбільш бажаним є pK_a від близько 4 до близько 7, тому що ці ліпіди будуть катіонними при низькому значенні pH препарату, тоді як частки будуть у значній мірі (хоча і не повністю) поверхнево нейтралізовані при фізіологічному значенні pH близько pH 7,4. Однією з переваг цієї pK_a є те, що щонайменше частина нуклеїнової кислоти, пов'язана із зовнішньою поверхнею частки, втрачатиме свою електростатичну активність при фізіологічному pH і буде видалена шляхом простого діалізу, що значно знижує сприйнятливості частки до очищення.

IV. Активні агенти

[0130] Активні агенти (наприклад, терапевтичні агенти) охоплюють будь-яку молекулу або сполуку, здатні надавати бажаний ефект на клітини, тканини, органи або суб'єкта. Такі ефекти можуть бути, наприклад, біологічними, фізіологічними та/або косметичними. Активні агенти можуть бути будь-яким типом молекули або сполуки, у тому числі нуклеїновими кислотами, пептидами, поліпептидами, малими молекулами, і їх сумішами, але не обмежуючись ними. Необмежуючі приклади нуклеїнових кислот охоплюють молекули інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК, Дайсер-субстратні дсРНК, мшРНК, аіРНК, та/або мікроРНК), антисмислові олігонуклеотиди, плазмідні, рибозими, імуностимулюючі олігонуклеотиди і їх суміші. Приклади пептидів або поліпептидів містять, без обмеження, антитіла (наприклад, поліклональні антитіла, моноклональні антитіла, фрагменти антитіл; гуманізовані антитіла, рекомбінантні антитіла, рекомбінантні людські антитіла, та/або антитіла, Primatized™), цитокіни, фактори зростання, фактори апоптозу, фактори, що індують диференціювання, рецептори клітинної поверхні і їх ліганди, гормони, а також їх суміші. Приклади малих молекул містять невеликі органічні молекули або сполуки, такі як будь-які звичайні агенти або лікарські засоби, відомі фахівцям у даній області, але не обмежуються ними.

[0131] У деяких варіантах реалізації активний агент є терапевтичним агентом, або його сіллю, або його похідним. Похідний терапевтичний агент може бути терапевтично активним сам по собі або він може бути проліками, які стають активними при подальшій модифікації. Таким чином, в одному варіанті реалізації похідне терапевтичного агента зберігає всю або деяку терапевтичну активність у порівнянні з немодифікованим агентом, тоді як в іншому варіанті реалізації, похідне терапевтичного агента представлено проліками, в яких відсутня терапевтична активність, але які стають активними після подальшої модифікації.

A. Нуклеїнові кислоти

[0132] У деяких варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом пов'язані з нуклеїновою кислотою, внаслідок чого одержують нуклеїнові кислотні-ліпідні частки (наприклад, LNP). У деяких варіантах реалізації нуклеїнова кислота повністю поміщена в ліпідну частку. Як використано в цьому описі, термін "нуклеїнова кислота" охоплює будь-який олігонуклеотид або полінуклеотид, з фрагментами, що містять до 60 нуклеотидів, які зазвичай називають олігонуклеотидами, і довші фрагменти, які називають полінуклеотидами. У конкретних варіантах реалізації, олігонуклеотиди за цим винаходом складаються з від близько 15 до близько 60 нуклеотидів у довжину. Нуклеїнові кислоти можуть бути введені окремо у ліпідні частки за цим винаходом, або в комбінації (наприклад, що спільно вводяться) з ліпідними частками за винаходом, що містять пептиди, поліпептиди, або невеликі молекули, такі як звичайні ліки.

[0133] У контексті цього винаходу, термін "полінуклеотид" і "олігонуклеотид" відносяться до полімеру, або олігомеру нуклеотиду або нуклеозидним мономерів, що складаються з основ, що зустрічаються у природі, цукрів і інтерцукрів (основ) лінкерів. Терміни "полінуклеотид" і "олігонуклеотид" також охоплюють полімери або олігомери, що містять мономери, які не зустрічаються у природі, або їх частини, які функціонують аналогічним чином. Такі модифіковані або заміщені олігонуклеотиди часто є бажаніше нативних форм через їх властивості, таких як, наприклад, підвищене клітинне поглинання, зменшена імуногенність, і підвищена стабільність у присутності нуклеаз.

[0134] Олігонуклеотиди зазвичай класифікуються як дезоксирибоолігонуклеотиди або рибоолігонуклеотиди. Дезоксирибоолігонуклеотиди складаються з 5-вуглецевого цукру, так званого дезоксирибоза, приєднаного ковалентно до фосфату в 5' і 3' атомах вуглецю цього

цукру з утворенням змінного, нерозгалуженого полімеру. Рибоолігонуклеотид складається з подібної структури, що повторюється, де 5-вуглецевий цукор є рибозою.

[0135] Нуклеїнова кислота, яка присутня у нуклеїновій кислотній частині відповідно до цього винаходу включає будь-яку форму відомої нуклеїнової кислоти. Нуклеїнові кислоти, використані у цьому документі, можуть бути одноланцюжковою ДНК або РНК, або дволанцюжковою ДНК або РНК, або ДНК-РНК гібридом. Приклади дволанцюжкової ДНК описані у цьому документі і містять, наприклад, структурні гени, гени, що містять контрольні і термінальні гени, і системи, що самореplikуються, такі як вірусна або плазмідна ДНК. Приклади дволанцюжкової РНК описані у цьому документі, і включають, наприклад, міРНК і інші агенти, такі як іРНК, Дайсер-субстратні дсРНК, мшРНК, аіРНК, і пре-мікроРНК. Одноланцюжкові нуклеїнові кислоти містять, наприклад, антисмислові олігонуклеотиди, рибозими, зрілі мікроРНК, і триплекс формуючі олігонуклеотиди.

[0136] Нуклеїнові кислоти згідно винаходу можуть бути різної довжини, що зазвичай залежить від конкретної форми нуклеїнової кислоти. Наприклад, у конкретних варіантах реалізації плазміді або гени можуть складатися з від близько 1000 до близько 100000 нуклеотидних залишків у довжину. У конкретних варіантах реалізації, олігонуклеотиди можуть варіюватися від близько 10 до близько 100 нуклеотидів у довжину. У різних варіантах реалізації, пов'язаних з олігонуклеотидами, як одноланцюжковими, дволанцюжковими, і триланцюжковими, можуть варіюватися по довжині від близько 10 до близько 60 нуклеотидів, від близько 15 до близько 60 нуклеотидів, від близько 20 до близько 50 нуклеотидів, з від близько 15 до близько 30 нуклеотидів, або від близько 20 до близько 30 нуклеотидів у довжину.

[0137] У конкретних варіантах реалізації олігонуклеотид (або його ланцюг) за винаходом специфічно гібридується з або є комплементарною послідовністю полінуклеотиду-мішені. Терміни "специфічно гібридується" і "комплементарні", що використовуються у цьому документі, показують достатню міру комплементу, так що між ДНК або РНК мішені і олігонуклеотид відбувається стабільне і специфічне зв'язування. Зрозуміло, що олігонуклеотид може не бути на 100% комплементарним цільовій послідовності нуклеїнової кислоти, аби специфічно гібридуватися. У бажаних варіантах реалізації олігонуклеотид специфічно гібридується, коли олігонуклеотид зв'язується з послідовністю-мішенню, що перешкоджає нормальній функції послідовності-мішені, щоб викликати втрату його корисності або експресії, і є достатня міра комплементарності, щоб уникнути неспецифічного зв'язування олігонуклеотида з послідовністю-немішенню в умовах, коли бажане специфічне зв'язування, тобто, у фізіологічних умовах у разі аналізів *in vivo* або терапевтичного лікування, або, в разі аналізів *in vitro*, в умовах, в яких аналізи проводяться. Таким чином, олігонуклеотид може включати 1, 2, 3 або більше базових замінів у порівнянні з ділянкою генної послідовності або мРНК, так що вона уражує або з якою вона специфічно гібридується.

1. міРНК

[0138] Компонент міРНК нуклеїнової кислотній частині за цим винаходом здатний викликати експресію цільового гена. Кожна нитка дуплексу міРНК, як правило, має від близько 15 до 60 нуклеотидів у довжину, бажано від близько 15 до близько 30 нуклеотидів у довжину. У деяких варіантах реалізації міРНК містить щонайменше один модифікований нуклеотид. Модифіковані міРНК, як правило, менш імуностимулюючі, ніж відповідні немодифіковані послідовності міРНК і зберігають активність іРНК відносно цільового гена. У деяких варіантах реалізації змінена міРНК містить щонайменше один 2'ОМе псечовинний або піримідиновий нуклеотид, такий як 2'ОМе-гуанозиновий, 2'ОМе-уридиновий, 2'ОМе-аденозиновий та/або 2'ОМе-цитозиновий нуклеотид. Модифіковані нуклеотиди можуть бути присутніми в одному ланцюзі (тобто, смислові і антисмислові) або в обох ланцюгах міРНК. У деяких бажаних варіантах реалізації один або більше з уридинового та/або гуанозинового нуклеотиду модифіковані (наприклад, 2'ОМе-модифікований) в одному ланцюзі (тобто, смисловий і антисмисловий) або обох ланцюгах міРНК. У цих варіантах реалізації змінена міРНК може додатково містити один або декілька модифікованих (наприклад, 2'ОМе-модифікований аденозин) та/або змінених (наприклад, 2'ОМе-модифіковані нуклеотиди) цитозинів. У інших бажаних варіантах реалізації лише уридинові та/або гуанозинові нуклеотиди є модифікованими (наприклад, 2'ОМе-модифікований) в одному ланцюзі (тобто, смислові і антисмислові) або в обох ланцюгах міРНК. МіРНК послідовності можуть мати виступи (наприклад, 3' або 5' виступи, як описано в Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188 (2001) або Nykanen et al., *Cell*, 107:309 (2001)), або можуть мати липкий кінець (тобто мають тупі кінці).

[0139] У конкретних варіантах реалізації селективне введення модифікованих нуклеотидів, таких як 2'ОМе-уридинових та/або гуанозинових нуклеотидів у дволанцюжкові ділянки однієї або обох ланцюгів міРНК зменшує або повністю відмінює імунну відповідь на цю міРНК молекулу. В

деяких випадках, імуностимулюючі властивості специфічних послідовностей міРНК і їх здатність вимикати експресію гена може бути оптимізована або врівноважена введенням мінімальних і селективних модифікацій 2'ОМе в дволанцюжкову область дуплексу міРНК. Це може бути досягнуто при терапевтично життєздатних дозах міРНК без індукції цитокінів, токсичності, і щоб уникнути нецільових ефектів, пов'язаних з використанням немодифікованої міРНК.

[0140] Модифіковані міРНК загалом містять від близько 1% до близько 100% (наприклад, від близько 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%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, або 100%) модифікованих нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці дуплексу міРНК. У деяких варіантах реалізації один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять або більше нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять модифіковані нуклеотиди. У деяких інших варіантах реалізації деякі або всі модифіковані нуклеотиди в дволанцюжковій ділянці міРНК є 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше нуклеотидами окремо один від одного. В одному з бажаних варіантів реалізації, жоден з модифікованих нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК не є суміжними один з одним (наприклад, існує розрив, щонайменше, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або немодифікованими нуклеотидами між кожним модифікованим нуклеотидом).

[0141] У деяких варіантах реалізації, менше ніж близько 50% (наприклад, менше ніж близько 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37% або 36%, бажано менше ніж близько 35%, 34%, 33%, 32%, 31% або 30%) нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять модифіковані (наприклад, 2'ОМе) нуклеотиди. У одному з аспектів цих варіантів реалізації, менше ніж близько 50% уридинових та/або гуанозинових нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці однієї або обох ланцюгів міРНК вибірково (наприклад, лише) змінені. В іншому аспекті цих варіантів реалізації, менше ніж близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах міРНК, який відрізняється тим, що міРНК містить щонайменше один 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид і принаймні один 2'ОМе-уридиновий нуклеотид, і де 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид і 2'ОМе-уридиновий нуклеотид є єдиними 2'ОМе нуклеотидами, присутніми в дволанцюжковій ділянці. У ще одному аспекті цих варіантів реалізації, менше ніж близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах модифікованої міРНК, в якому міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди, вибрані з групи, що складається з 2'ОМе-гуанозинових нуклеотидів, 2'ОМе-уридинових нуклеотидів, 2'ОМе-аденозинових нуклеотидів і їх сумішей, і де міРНК не містить 2'ОМе-цитозинових нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці. У ще одному аспекті цих варіантів реалізації, менше ніж близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК включає 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах міРНК, в якому міРНК містить щонайменше один 2'ОМе-гуанозин нуклеотид і принаймні один 2'ОМе-уридин нуклеотидів, і де міРНК не містить 2'ОМе-цитозин нуклеотидів в дволанцюжковій ділянці. У іншому аспекті цих варіантів реалізації, менше ніж близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що містять міРНК 2'ОМе нуклеотидів в обох ланцюгах модифікованої міРНК, в якому міРНК складається з 2'ОМе нуклеотидів, вибраних з групи, що складається з 2'ОМе-гуанозинових нуклеотидів, 2'ОМе-уридинових нуклеотидів, 2'ОМе-аденозинових нуклеотидів і їх сумішей, і де нуклеотиди 2'ОМе у дволанцюжковій ділянці знаходяться не поруч один з одним.

[0142] У інших варіантах реалізації, від близько 1% до близько 50% (наприклад, від близько 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 25%-39%, 25%-38%, 25%-37%, 25%-36%, 26%-39%, 26%-38%, 26%-37%, 26%-36%, 27%-39%, 27%-38%, 27%-37%, 27%-36%, 28%-39%, 28%-38%, 28%-37%, 28%-36%, 29%-39%, 29%-38%, 29%-37%, 29%-36%, 30%-40%, 30%-39%, 30%-38%, 30%-37%, 30%-36%, 31%-39%, 31%-38%, 31%-37%, 31%-36%, 32%-39%, 32%-38%, 32%-37%, 32%-36%, 33%-39%, 33%-38%, 33%-37%, 33%-36%, 34%-39%, 34%-38%, 34%-37%, 34%-36%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 21%-35%, 22%-35%, 23%-35%, 24%-35%, 25%-35%, 26%-35%, 27%-35%, 28%-35%, 29%-35%, 30%-35%, 31%-35%, 32%-35%, 33%-35%, 34%-35%, 30%-34%, 31%-34%, 32%-34%, 33%-34%, 30%-33%, 31%-33%, 32%-33%, 30%-32%, 31%-32%, 25%-34%, 25%-33%, 25%-32%, 25%-31%, 26%-34%, 26%-33%, 26%-32%, 26%-31%, 27%-34%, 27%-33%, 27%-32%, 27%-31%, 28%-34%, 28%-33%, 28%-32%, 28%-31%, 29%-34%, 29%-33%, 29%-32%, 29%-31%, 5%-30%, 10%-30%, 15%-30%, 20%-34%, 20%-33%, 20%-32%, 20%-31%, 20%-30%, 21%-30%, 22%-30%, 23%-30%, 24%-30%, 25%-30%, 25%-29%, 25%-28%, 25%-27%, 25%-26%, 26%-30%, 26%-29%, 26%-28%, 26%-27%, 27%-30%, 27%-29%, 27%-28%,

28%-30%, 28%-29%, 29%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-29%, 20%-28%, 20%-27%, 20%-26%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15%, або 5%-10%) нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять модифіковані нуклеотиди. В одному з аспектів цих варіантів реалізації, від близько 1% до близько 50% уридинових та/або гуанозинових нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці одного або обох ланцюгів міРНК вибірково (наприклад, лише) змінені. В іншому аспекті цих варіантів реалізації, від близько 1% до близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК включає 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах киРНК, що відрізняється тим, що міРНК містить, щонайменше один 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид і принаймні один 2'ОМе-уридиновий нуклеотид, і де 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид і 2'ОМе-уридиновий нуклеотид є єдиними 2'ОМе нуклеотидами, присутніми у дволанцюжковій ділянці. У ще одному аспекті цих варіантів реалізації, від близько 1% до близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах модифікованої міРНК, де міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди, вибрані з групи, що складається з 2'ОМе-гуанозинових нуклеотидів, 2'ОМе-уридинових нуклеотидів, 2'ОМе-аденозинових нуклеотидів і їх сумішей, і де міРНК не містить 2'ОМе-цитозинових нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці. У ще одному аспекті цих варіантів реалізації, від близько 1% до близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди в обох ланцюгах міРНК, в якому міРНК містить щонайменше один 2'ОМе-гуанозин нуклеотиду і принаймні один 2'ОМе-уридин нуклеотидів, і де міРНК не містить 2'ОМе-цитозин нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці. В іншому аспекті цих варіантів реалізації, від близько 1% до близько 50% нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять 2'ОМе нуклеотиди, які відрізняються тим, що містять міРНК 2'ОМе нуклеотидів в обох ланцюгах модифікованої міРНК, де міРНК складається з 2'ОМе нуклеотидів, вибраних з групи, що складається з 2'ОМе-гуанозинових нуклеотидів, 2'ОМе-уридинових нуклеотидів, 2'ОМе-аденозинових нуклеотидів і їх сумішей, і де нуклеотиди 2'ОМе у дволанцюжковій ділянці знаходяться не поруч один з одним.

[0143] Додаткові діапазони, відсотки і зразки модифікацій, які можуть бути введені в міРНК, описані в заявці на патент США № 2007/0135372, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

а) Селекція послідовностей міРНК

[0144] Прийнятні послідовності міРНК можуть бути ідентифіковані з використанням будь-яких засобів, відомих у даній області. Як правило, способи, описані в Elbashir et al., Nature, 411:494-498 (2001) і Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888 (2001) поєднуються з алгоритмом конструктивного розрахунку, викладеними в Reynolds et al., Nature Biotech., 22(3):326-330 (2004).

[0145] Як необмежуючий приклад, нуклеотидна послідовність 3' ініціаторного AUG кодона транскрипта з гена-мішені, що цікавить, може бути сканована на динуклеотидні послідовності (наприклад, AA, NA, CC, GG, або UU, де N = C, G або U) (див., наприклад, Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888 (2001)). Нуклеотиди безпосередньо 3' з динуклеотидними послідовностями визначені як потенційні послідовності міРНК (тобто послідовностей-мішеней або ланцюгів смислових послідовностей). Як правило, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 або більше нуклеотидів безпосередньо 3' з динуклеотидними послідовностями визначені як потенційні послідовності міРНК. У деяких варіантах реалізації динуклеотидна послідовність є AA або послідовність NA і 19 нуклеотидів безпосередньо 3' до AA або NA динуклеотидам ідентифіковані як потенційні послідовності міРНК. Послідовності міРНК, як правило, розташовані в різних положеннях уздовж довжини гена-мішені. Для подальшого підвищення ефективності виключення міРНК послідовностей, потенційні послідовності міРНК можуть бути проаналізовані, щоб визначити ділянки, які не містять області гомології з іншими кодуючими послідовностями, наприклад, у цільовій клітині або організмі. Наприклад, відповідна послідовність міРНК має близько 21 пару основ, як правило, не більше ніж 16-17 суміжних пар основ, гомологічних з кодуючою послідовністю в клітині-мішені або організмі. Якщо послідовності міРНК не мають бути експресовані від промотора РНК Pol III, послідовності міРНК не вистачає на більше ніж 4 суміжними А або Т, які були вибрані.

[0146] Після того, як потенційні послідовності міРНК були ідентифіковані, комплементарна послідовність (тобто послідовність антисмислового ланцюга) може бути розроблена. Потенційна послідовність міРНК також може бути проаналізована з використанням різних критеріїв, відомих у даній області. Наприклад, для підвищення ефективності їх виключення, міРНК послідовності можуть бути проаналізовані за допомогою алгоритму конструктивного розрахунку для ідентифікації послідовностей, які мають одну або більше з наступних ознак: (1) вміст G/C від близько 25% до близько 60% G/C; (2) щонайменше, 3 A/U зв'язаними у

положеннях 15-19 смислового ланцюгу; (3) не включаючи внутрішні повтори; (4) у положенні 19 смислового ланцюгу; (5) у положенні 3 смислового ланцюгу; (6) U в положенні 10 смислового ланцюгу; (7) G/C у положенні 19 смислового ланцюгу; і (8) без G у положенні 13 смислового ланцюгу. Конструкторські інструменти міРНК, які містять алгоритми, які привласнюють відповідні значення кожної з цих особливостей і корисних для відбору міРНК, можна знайти на, наприклад, <http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siPHK/siPHK.html>. Спеціалісту в даній області техніки буде зрозуміло, що послідовності з одним або декількома з вказаних вище характеристик, можуть бути вибрані для подальшого аналізу і випробувань як потенційні послідовності міРНК.

[0147] Крім того, потенційні послідовності міРНК з одним або більше з наступних критеріїв часто можуть бути усунені, як міРНК: (1) послідовності, що містять ділянку 4 або більше однакових основ у ряду; (2) послідовності, що містять гомополімери G (тобто, для того, щоб зменшити можливі неспецифічні ефекти, обумовлені структурними характеристиками цих полімерів); (3) послідовності, що містять потрійні базові мотиви (наприклад, GGG, CCC, AAA, або TTT); (4) послідовності, що містять ділянки 7 або більше G/C у рядку, і (5), послідовності, що містять прямі повтори, з 4 або більше базових з кандидатами, результуючими у внутрішній структури, загнуті назад. Проте, фахівцям у даній області буде зрозуміло, що послідовності з одним або декількома з вищезгаданих характеристик усе ж можуть бути вибрані для подальшого аналізу і випробувань як потенційні послідовності міРНК.

[0148] У деяких варіантах реалізації потенційні послідовності міРНК можуть бути додатково проаналізовані на основі дуплексної асиметрії міРНК, як описано, наприклад, у Khvorova et al., Cell, 115:209-216 (2003); і Schwarz et al., Cell, 115:199-208 (2003). В інших варіантах реалізації потенційні послідовності міРНК можуть бути додатково проаналізовані на основі вторинної структури в сайті-мішені, як описано, наприклад, у Luo et al., Biophys. Res. Commun., 318:303-310 (2004). Наприклад, вторинна структура у сайті-мішені може бути змодельована за допомогою алгоритму Mfold (доступний на http://mfold.burnet.edu.au/PHK_form), щоб вибрати міРНК послідовності, які сприяють доступу на сайті-мішені, де менше вторинної структури, яка присутня у формі парних основ і створених петель.

[0149] Після того, як потенційна послідовність міРНК була визначена, послідовність може бути проаналізована на предмет наявності будь-яких імуностимулюючих властивостей, наприклад, з використанням *in vitro* цитокинового аналізу або *in vivo* в тваринній моделі. Мотиви в смислових, і антисмислових ланцюгах послідовності міРНК, такі як GU-багаті мотиви (наприклад, 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', і так далі) можуть також забезпечувати індикацію, якщо послідовність буде імуностимулюючою. Після того, як молекула міРНК виявляється імуностимулюючою, вона може бути змінена для того, щоб зменшити її імуностимулюючі властивості, як описано в цьому документі. Як необмежуючий приклад, послідовність міРНК може контактувати з клітиною-респондером ссавця у таких умовах, що клітина продукує імунну відповідь, що виявляється, щоб визначити, чи є міРНК імуностимулюючою або неімуностимулюючою міРНК. Клітина-респондер ссавця може бути від нативних ссавців (наприклад, у ссавця, який раніше не був у контакті з генним продуктом послідовності міРНК). Клітина-респондер ссавця може бути, наприклад, периферичною мононуклеарною клітиною крові (PBMC), макрофагом і тому подібним. Імунна відповідь, що виявляється, може включати продукції цитокінів або факторів зростання, таких як, наприклад, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, або їх комбінацією. Молекули міРНК визначені як імуностимулюючі можуть бути модифіковані, щоб зменшити її імуностимулюючі властивості шляхом заміни щонайменше одного з нуклеотидів смислового та/або антисмислового ланцюга модифікованими нуклеотидами. Наприклад, менше ніж близько 30% (наприклад, менше ніж близько 30%, 25%, 20%, 15%, 10% або 5%) нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці дуплексу міРНК можуть бути замінені модифікованими нуклеотидами, такими як 2'OMe нуклеотиди. Модифіковані міРНК можуть потім вступити в контакт з клітинами-респондерами ссавця, як описано вище, щоб підтвердити, що їх імуностимулюючі властивості були зменшені або скасовані.

[0150] Прийнятні *in vitro* тести для визначення імунної відповіді охоплюють, але не обмежуються ними, методика сендвич-імуноаналіза подвійного моноклонального антитіла по David et al. (U.S. Patent No. 4,376,110); сендвич-аналіз моноклонально-поліклональних антитіл (Wide et al., in Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh (1970)); Метод "Вестерн-блоттинг" Gordon et al. (U.S. Patent No. 4,452,901); імунопреципітація міченого ліганда (Brown et al., J. Biol. Chem., 255:4980-4983 (1980)); ензим-зв'язуючий імуоферментний аналіз (ELISA), як описано, наприклад, у Raines et al., J. Biol. Chem., 257:5154-5160 (1982); імуноцитохімічні способи, у тому числі використання фторохромів (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39:477 (1980)); і нейтралізацію активності (Bowen-Pope et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2396-2400 (1984)). На додаток до описаних вище імунологічних досліджень, доступний ряд інших імунологічних досліджень, у тому числі тих, які описані в патентах США № 3817827; 3850752; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; і 4098876. Розкриття цих посилань включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0151] Необмежуючий приклад *in vivo* моделі для виявлення імунної відповіді містить *in vivo* дослідження індукції цитокінів мишей, як описано, наприклад, у Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505 (2006). У деяких варіантах реалізації, аналіз може бути виконаний таким чином: (1) міРНК можуть бути введені за допомогою стандартної внутрішньовенної ін'єкції у бічну хвостову вену; (2) кров може бути відібрана через сердечну пункцію через близько 6 годин після введення і оброблена, як плазма для аналізу цитокінів; і (3) цитокіни можуть бути порашовані з використанням сендвич ELISA комплектів відповідно до інструкцій виготівника (наприклад, мишасті і людські IFN- α (PBL Biomedical; Piscataway, NJ); людські IL-6 і TNF- α (eBioscience; San Diego, CA); і мишачі IL-6, TNF- α , і IFN- γ (BD Biosciences; San Diego, CA)).

[0152] Моноклональні антитіла, які специфічно зв'язують цитокіни і фактори зростання, є комерційно доступними з різних джерел і можуть бути створені з використанням способів, відомих у даній області (див., наприклад, Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) and Harlow and Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication, New York (1999)). Генерування моноклональних антитіл було описане раніше, і може бути виконано будь-яким способом, відомих у даній області техніки (Buhring et al., in Hybridoma, Vol. 10, No. 1, pp. 77-78 (1991)). У деяких способах, моноклональне антитіло помічають (наприклад, будь-якою композицією, яка виявляється спектроскопічними, фотохімічними, біохімічними, електричними, оптичними, або хімічними засобами) для полегшення виявлення.

б) Генеруючі молекули міРНК

[0153] МіРНК можуть бути представлені в різних формах, включаючи, наприклад, у вигляді одного або що більше ізольованих малих-інтерферуючих РНК (міРНК) дуплексів, у вигляді довгих дволанцюжкових РНК (длРНК), або у вигляді транскрибованих міРНК або длРНК від касети транскрипції в плазмідній ДНК. У деяких варіантах реалізації, міРНК, можуть бути отримані ферментативно або частично/повністю органічним синтезом, і модифіковані рибонуклеотиди можуть бути введені за допомогою *in vitro* ферментативного або органічного синтезу. У деяких випадках, кожен ланцюг одержують хімічним шляхом. Способи синтезу молекул РНК, відомі у даній області, наприклад, способи хімічного синтезу, як описано у Verma and Eckstein (1998), або як описано у цьому документі.

[0154] Популяція РНК може бути використана для забезпечення довгих РНК-попередників, або довгих РНК-попередників, які мають істотну або повну схожість з вибраною послідовністю-мішенню і можуть бути використані, щоб одержати міРНК. РНК може бути виділена з клітин або тканин, синтезована, та/або клонована відповідно до способів, добре відомих фахівцям у даній області. РНК може бути у змішаній популяції (одержана з клітин або тканин, транскрибованих з кДНК, заміщена, вибрана, і так далі), або може бути єдиною послідовністю-мішенню. РНК може бути такою, що зустрічається в природі (наприклад, виділена із зразків тканини або клітин), синтезована *in vitro* (наприклад, з використанням T7 або SP6 полімерази і PCR-продуктів або клонованої кДНК), або хімічно синтезованою.

[0155] Для того, щоб сформувати довгу длРНК для синтетичних РНК, комплемент також транскрибується у пробірку і гібридизується з утворенням длРНК. При використанні популяції, що зустрічається у природі, РНК, РНК комплемент також передбачений (наприклад, для формування длРНК для розщеплювання E. coli РНКазі III або Дайсер), наприклад, шляхом транскрипції кДНК, що відповідає популяції РНК, або за допомогою РНК-полімерази. РНК-попередники потім гібридизують з утворенням дволанцюжкових РНК для розщеплювання. ДлРНК можуть бути безпосередньо введені суб'єктові або можуть бути розщеплені *in vitro* перед введенням.

[0156] Способи виділення РНК, синтез РНК, гібридизація нуклеїнових кислот, створення і скринінг бібліотек кДНК, і постановка PCR добре відомі у даній області (див., наприклад, Gubler and Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra), як і PCR способи (див, патенти США № 4683195 і 4683202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)). Бібліотеки експресії також добре відомі фахівцям у даній області. Додаткові базові тексти, що розкривають загальні способи використання у цьому винаході, охоплюють Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); та Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994). Розкриття цих посилань включені в цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0157] Бажно, міРНК є хімічно синтезованими. Олігонуклеотиди, які містять молекули міРНК за винаходом, можуть бути синтезовані з використанням будь-якої з безлічі методик, відомих у даній області, таких як ті, що описані в Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); та Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). Синтез олігонуклеотидів використовує поширені нуклеїново-кислотні поєднувальні і захисні групи, такі як диметокситритил на 5'-кінці і фосфорамідитів на 3'-кінці. Як необмежувачий приклад, дрібномасштабний синтез може проводитися на синтезаторі Applied Biosystems з використанням протоколу масштабу 0,2 мкмоль. Крім того, синтез при масштабі шкали 0,2 мкмоль може бути виконаний на синтезаторі 96-лункового планшета від Protogene (Palo Alto, CA). Проте, більший або менший масштаб синтезу також входить в обсяг цього винаходу. Прийнятні реагенти для синтезу олігонуклеотидів, способів видалення захисних для РНК груп і способи очищення РНК відомі фахівцям у цій області техніки.

[0158] Молекули міРНК також можуть бути синтезовані за допомогою методики тандемного синтезу, в якому обидва ланцюга синтезуються у вигляді одного безперервного олігонуклеотидного фрагмента або ланцюга, розділених розщеплюваним лінкером, який потім розщеплюється, щоб забезпечити окремі фрагменти або ланцюги, які гібридизуються з утворенням дуплексу міРНК. Лінкер може бути полінуклеотидним лінкером або нуклеотидним лінкером. Тандемний синтез міРНК може бути легко адаптований до обох багатолункових/багатодискових платформ синтезу, а також платформам синтезу великого масштабу, що використовують періодичні реактори, колони синтезу, і тому подібне. З іншого боку, молекули міРНК можуть бути зібрані з двох окремих олігонуклеотидів, в яких один олігонуклеотид містить смисловий ланцюг, а інший містить антисмисловий ланцюг міРНК. Наприклад, кожен ланцюг може бути синтезований окремо і з'єднуватися разом за допомогою гібридизації або лігування після синтезу та/або зняття захисту. У деяких інших випадках, молекули міРНК можуть бути синтезовані у вигляді одного безперервного олігонуклеотидного фрагмента, де самокомплементарна смислова і антисмислова ділянки гібридизують з утворенням міРНК дуплексу, що має вторинну структуру шпильки.

е) Модифіковані послідовності міРНК

[0159] У деяких аспектах, молекули міРНК містять дуплекс, що має два ланцюги і щонайменше один модифікований нуклеотид у дволанцюжковій ділянці, в якій кожен ланцюг має від близько 15 до близько 60 нуклеотидів у довжину. Бажано, модифіковані міРНК є менш імуностимулюючими, ніж відповідні немодифіковані послідовності міРНК, але зберігають здатність вимикати експресію послідовності-мішені. У бажаних варіантах реалізації міра хімічної модифікації введеної в молекулу міРНК порушує баланс між зменшенням або відміною імуностимулюючої властивості міРНК і утриманням активності іРНК. Як необмежувачий приклад, молекула міРНК, яка націлена на ген, що цікавить, може бути мінімально модифікована (наприклад, менше ніж на близько 30%, 25%, 20%, 15%, 10% або 5% модифікована) при селекції уридинового та/або гуанозинового нуклеотидів у межах дуплексу міРНК для усунення імунної відповіді, згенерованої міРНК, при збереженні своєї здатності вимикати експресію гена-мішені.

[0160] Приклади модифікованих нуклеотидів, придатних для використання в цьому винаході, охоплюють рибонуклеотиди, що мають 2'-О-метил-(2'OMe), 2'-дезоксид-2'-фтор (2'F), 2'-дезоксид-5-С-метил, 2'-О-(2-метоксиетил) (MOE), 4'-тіо, 2'-аміно або 2'-С-аліл, але не обмежуються ними. Модифіковані нуклеотиди, що мають Нозерн конформацію, такі як шоті, які описані, наприклад, у Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag Ed. (1984), також є прийнятними для використання у молекулах міРНК. Такі модифіковані нуклеотиди охоплюють, без обмеження, замкнуті нуклеїнові кислоти (LNA) нуклеотидів (наприклад, 2'-О, 4'-С-метилден-(Д-рибофуранозил) нуклеотидів), 2'-О-(2-метоксиетил) (MOE) нуклеотидів, 2'-метилтіо-етил нуклеотидів, 2'-дезоксид-2'-фтор (2'F) нуклеотидів, 2'-дезоксид-2'-хлор (2'Cl) нуклеотидів і 2'-азидо нуклеотидів. У деяких випадках, молекули міРНК, описані в цьому документі, містять один або більше G-закримних нуклеотидів. G-закрим відноситься до нуклеотидного модифікованого цитозинового аналогу, в якому модифікації додають здатність до водневого зв'язку як Уотсона-Кріка, так і Хугстена стикатися з гуаніновим комплементарним нуклеотидом у дуплексі (см, наприклад, Lin et al., J. Am. Chem. Soc., 120:8531-8532 (1998)). Крім того, нуклеотиди, що мають нуклеотидний базовий аналог, такі як, наприклад, С-феніл, С-нафтил, інші ароматичні похідні, інозин, азол карбоксаміди і нітроазол похідні, такі як 3-нітропірол, 4-нітроіндол, 5-нітроіндол, і 6-нітроіндол (див., наприклад, Loakes, Nucl. Acids Res., 29:2437-2447 (2001)) можуть бути включені в молекули міРНК.

[0161] У деяких варіантах реалізації молекули міРНК можуть додатково містити один або

декілька хімічних модифікацій, таких як фрагменти термінального кепу, фосфатні модифікації скелета, і тому подібне. Приклади фрагментів кінцевих кепів охоплюють, без обмеження, інвертовані дезокси безосновні залишки, модифікації гліцерину, 4',5'-метилен нуклеотида, 1-(β-D-еритрофуранозил) нуклеотида, 4'-тіо нуклеотида, карбоциклічні нуклеотида, 1,5-ангідрогекситол нуклеотида, L-нуклеотида α-нуклеотида, модифіковані основи нуклеотидів, 5-трео-пентафуранозил нуклеотида, ациклічні 3',4'-втор нуклеотида, ациклічні 3,4-дигідроксибутил нуклеотида, ациклічні 3,5-дигідроксипентил нуклеотида, 3'3'-інвертовані нуклеотидні фрагменти, 3'-3'-інвертовані безосновні фрагменти, 3'-2'-інвертовані нуклеотидні фрагменти, 3'-2'-інвертовані безосновні фрагменти, 5'-5'-інвертовані нуклеотидні фрагменти, 5'-5'-інвертовані безосновні фрагменти, 3'-5'-дезокси інвертовані безосновні фрагменти, 5'-аміно-алкіл, фосфат, 1,3-діаміно-2-пропіл фосфат, 3-амінопропіл фосфат, 6-аміногексил фосфат, 1,2-амінододецил фосфат, фосфат гідроксипропіл, 1,4-бутандіол фосфат, 3'-фосфонової кислоти, 5'-фосфорної кислоти, гексилфосфат, аміногексил фосфат, 3'-фосфат-, 5'-аміно-, 3'-фосфоротіоат, 5'-фосфоротіоат, фосфородитіоат, і утворення зшивання або неутворення зшивання метилфосфонатними або 5'-меркапто фрагментами (див., наприклад, патент США № 5998203; Beaucage et al., Tetrahedron 49:1925 (1993)). Необмежуючі приклади модифікації фосфатних скелетів (результуючі у модифіковані міжнуклеотидні зв'язки) охоплюють фосфоротіоатні, фосфородитіоатні, метилфосфонатні, фосфотриєфірні, морфолінові, амідатні, карбаматні, карбоксиметилцеллюлозні, ацетомедіатні, поліамідні, сульфонатні, сульфонамідні, сульфаматні, формацетальні, тіоформацетальні, і алкілсилільні заміни (см, наприклад, Hunziker et al., Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, у Modern Synthetic Methods, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, у Carbohydrate Modifications in Antisense Research, ACS, 24-39 (1994)). Такі хімічні модифікації можуть відбуватися на 5'-кінці та/або 3'-кінці смислового ланцюга, антисмислового ланцюга або обох ланцюгів міРНК. Розкриття цих посилань включене у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0162] У деяких варіантах реалізації, смисловий та/або антисмисловий ланцюг молекули міРНК може додатково містити 3'-кінцевий виступ, що має близько від 1 до 4 (наприклад, 1, 2, 3 або 4) 2'-дезокси рибонуклеотидів, модифікованого (наприклад, 2'ОМе) та/або немодифікованого уридинового рибонуклеотиду, і будь-яку іншу комбінацію модифікації (наприклад, 2'ОМе) і немодифікованих нуклеотидів.

[0163] Додаткові приклади модифікованих нуклеотидів і типів хімічних модифікацій, які можуть бути введені у молекулу міРНК, описані, наприклад, у патенті Великобританії GB 2397818 В і публікації заявки на патент США № 2004/0192626, 2005/0282188 і 2007/0135372, вміст яких включений у цей опис як посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0164] Молекули міРНК, описані у цьому документі, можуть необов'язково містити один або декілька нуклеотидів в одній або обох ланцюгах міРНК. Як використано в цьому описі, термін "нуклеотид" відноситься до будь-якої групи або сполуки, які можуть бути включені у ланцюг нуклеїнової кислоти за місцем одного або декількох нуклеотидних одиниць, у тому числі цукри та/або фосфатні заміни, і дозволяють основам, що залишилися, проявляти активність. Група сполук є безосновною, якщо вона не містить загальновізнані нуклеотидні основи, такі як аденозин, гуанін, цитозин, урацил або тимін і, отже, не мають основи в 1'-положенні.

[0165] В інших варіантах реалізації, хімічна модифікація міРНК містить прикріплення кон'югата до молекули міРНК. Кон'югат може бути прикріплений на 5' та/або 3'-кінець смислового та/або антисмислового ланцюга міРНК через ковалентний зв'язок, такий як, наприклад, біорозкладаний лінкер. Кон'югат може бути також прикріплений до міРНК, наприклад, через карбаматну групу або іншу зв'язуючу групу (див., наприклад, публікації заявки на патент США Nos. 2005/0074771, 2005/0043219 і 2005/0158727). У деяких випадках, кон'югатом є молекула, яка полегшує доставку кіРНК у клітину. Приклади кон'югатів молекул, прийнятих для прикріплення до міРНК охоплюють, без обмеження, стероїди, такі як холестерин, гліколи, такі як поліетиленгліколь (PEG), людський сироватковий альбумін (HSA), жирні кислоти, каротиноїди, терпени, жовчні кислоти, фолати (наприклад, фолієві кислоти, аналоги фолієвої кислоти і їх похідні), цукри (наприклад, галактоза, галактозамін, N-ацетил-галактозамін, глюкоза, маноза, фруктоза, фукоза і так далі), фосфоліпіди, пептиди, ліганди для клітинних рецепторів, здатних опосередковувати клітинне поглинання і їх комбінації (див., наприклад, публікацію заявки на патент США №№ 2003/0130186, 2004/0110296, і 2004/0249178; патент США № 6753423). Інші приклади охоплюють ліпофільний фрагмент, вітаміни, полімери, пептиди, білок, нуклеїнову кислоту, малу молекулу, олігосахарид, вуглеводний кластер, інтеркалятор, білок, що зв'язується з малою борозною, розщеплюючі агенти, і зшиваючі агенти молекул кон'югата, описаного в публікації заявки на патент США № 2005/0119470 і

2005/0107325. Проте, інші приклади охоплюють 2'-О-алкіламін, 2'-О-алкоксіалкіл амін, поліамін, С5-катионний модифікований піримідин, катионний пептид, гуанідинову групу, амідиніум групу, катионні амінокислотні молекули кон'югата, описаного в заявці на патент США публікація № 2005/0153337. Додаткові приклади охоплюють гідрофобні групи, мембранні активні сполуки, клітина-проникаючі сполуки, сигнали клітинної орієнтації, інтеракційні модифікати, і просторові стабілізатори молекул кон'югата, описані в заявці на патент США № 2004/0167090. Додаткові приклади охоплюють молекули кон'югата, описаного в заявці на патент США № 2005/0239739. Тип використовуваного кон'югата і міра кон'югації з молекулою міРНК можуть бути оцінені для покращення фармакокінетичних профілів, біологічної доступності та/або стабільності міРНК, зберігаючи при цьому активність іРНК. Таким чином, фахівець у даній області може знайти молекули міРНК, що мають різні кон'югати, приєднані до неї, щоб ідентифікувати ті, що мають покращені властивості і повну іРНК активність, використовуючи будь-яку з множини добре відомих *in vitro* клітинних культур або в *in vivo* тваринних моделях. Розкриття описаних вище патентних документів включене у цей опис як посилання у повному обсязі для всіх цілей.

d) Гени-мішені

[0166] Компонент міРНК нуклеїнової кислотного-ліпідної часток, описаних у цьому документі, можуть бути використані для придушення або виключення трансляції (тобто, експресії) гена, що цікавить. Гени, що цікавлять, охоплюють гени, що асоціюються з вірусною інфекцією і експресією, гени, пов'язані з метаболічними захворюваннями і розладами (наприклад, захворювання печінки і розлади), гени, пов'язані з пухлинами або трансформованими клітинами (наприклад, раку), ангіогенні гени, гени-імуномодулятори, такі як ті, які пов'язані із запальними і аутоімунними реакціями, гени рецепторів ліганда і гени, що асоціюються з нейродегенеративними розладами, але не обмежуються ними.

[0167] У конкретних варіантах реалізації, цей винахід забезпечує суміш з двох, три, чотири, п'яти, шести, семи, восьми, дев'яти, десяти або більше молекул міРНК, які вимикають експресію декількох генів, що представляють інтерес. У деяких варіантах реалізації суміш з молекул міРНК, які повністю заключених у ліпідну частку, таку як нуклеїнову кислотного-ліпідну частку (наприклад, LNP). Молекули міРНК можуть бути спільно поміщені у ту ж ліпідну частку, або кожен вид міРНК, присутній у суміш, може бути приготований у вигляді окремих часток.

[0168] Гени, пов'язані з вірусною інфекцією і виживанням, охоплюють ті, що експресуються господарем (наприклад, фактор господаря, наприклад, тканинний чинник (TF)) або вірус зв'язується, включається, і реплікується у клітині. Особливий інтерес представляють вірусні послідовності, що асоціюються з хронічними вірусними захворюваннями. Особливо цікаві вірусні послідовності містять послідовності Філовірусів, таких як вірус Ебола і Марбург вірус (див., наприклад, Geisbert et al., J. Infect. Dis., 193:1650-1657 (2006)); Аренавірусів, таких як вірус Ласса, вірус Хунін, вірус Мачупо, вірус Гуанаріто і вірус Сабіа (Buchmeier et al., Arenaviridae: the viruses and their replication, In: Fields Virology, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001)); вірусів грипу, таких як грип А, В, і С віруси (див., наприклад, Steinhauer et al., Annu Rev Genet., 36:305-332 (2002); i Neumann et al., J Gen Virol., 83:2635-2662 (2002)); вірусів гепатиту (див., наприклад, Hamasaki et al., FEBS Lett., 543:51 (2003); Yokota et al., EMBO Rep., 4:602 (2003); Schlomai et al., Hepatology, 37:764 (2003); Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:2783 (2003); Kapadia et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:2014 (2003); i Fields Virology, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001)); Вірус Імунодефіцита Людини (ВІЛ) (Banerjee et al., Mol. Ther., 8:62 (2003); Song et al., J. Virol., 77:7174 (2003); Stephenson, JAMA, 289:1494 (2003); Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:183 (2003)); Герпес віруси (Jia et al., J. Virol., 77:3301 (2003)); i Вірус Папіломи Людини (HPV) (Hall et al., J. Virol., 77:6066 (2003); Jiang et al., Oncogene, 21:6041 (2002)).

[0169] Прикладні Філовірусні послідовності нуклеїнових кислот, які можна вимкнути, містять послідовності нуклеїнових кислот, що кодують структурні білки (наприклад, VP30, VP35, нуклеопротеїн (NP), полімеразний білок (L-Pol)) і мембранно-зв'язані білки (наприклад, VP40, глікопротеїн (ГП), VP24), але не обмежуються ними. Повні послідовності генома для вірусу Ебола викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_002549; AY769362; NC_006432; NC_004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; i AF086833. Послідовності вірусу Ебола VP24 викладені, наприклад, у ГенБанк № U77385 i AY058897. Послідовності Вірусу Ебола L-Pol викладені в, наприклад, ГенБанк № X67110. Послідовності Вірусу Ебола VP40 викладені в, наприклад, ГенБанк № AY058896. Послідовності Вірусу Ебола NP викладені, наприклад, в ГенБанк № AY058895. Послідовності Вірусу Ебола GP викладені, наприклад, в ГенБанк № AY058898; Sanchez et al., Virus Res., 29:215-240 (1993); Will et al., J. Virol., 67:1203-1210 (1993); Volchikov et al., FEBS Lett., 305:181-184 (1992); i патенті США № 6713069. Додаткові послідовності вірусу Ебола викладені, наприклад, у ГенБанк № L11365 i

X61274. Повні послідовності генома для вірусу Марбурга викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_001608; AY430365; AY430366; і AY358025. GP послідовності вірусу Марбурга викладені, наприклад, у ГенБанк № AF005734; AF005733; і AF005732. Послідовності Марбург Вірусу VP35 викладені у, наприклад, ГенБанк № AF005731 і AF005730. Додаткові послідовності Марбург вірусу викладені, наприклад, у ГенБанк № X64406; Z29337; AF005735; і Z12132. Не обмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують послідовності нуклеїнової кислоти вірусу Ебола і Марбург вірусу включають ті, які описані в заявці на патент США № 2007/0135370 і попередньої заявки США № 61/286741, поданої 15 грудня 2009, розкриття яких включені у цей документ шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0170] Прикладні послідовності нуклеїнових кислот ареновірусу, які можуть бути вимкнені, містять послідовності нуклеїнових кислот, що кодують нуклеопротеїн (NP), глікопротеїн (GP), L-полімеразу (L), і Z білок (Z), але не обмежуються ними. Повні послідовності генома для вірусу лихоманки Ласса викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_004296 (LASV сегмент S) і NC_004297 (LASV сегмент L). Необмежуючі приклади молекул міРНК, направлених на послідовності нуклеїнових кислот вірусу Ласса, включають ті, що описані в попередній заявці США № 61/319855, поданої 31 березня 2010, вміст якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0171] Приклади послідовностей нуклеїнових кислот господарів, які можуть бути вимкнені, включають послідовності нуклеїнових кислот, кодуючих чинників, що містять такі, як тканинний чинник (TF), який, як відомо, відіграє важливу роль у патеногенезі вірусів геморагічної лихоманки, але не обмежуються ними. Послідовність мРНК TF викладено в ГенБанк № NM_001993. Фахівцям у даній області техніки буде зрозуміло, що TF також відомий як F3, фактор згортання крові III, тромбопластин і CD142. Необмежуючі приклади молекул міРНК, орієнтованих на послідовності нуклеїнових кислот TF, містять ті, які описані в попередній заявці США № 61/319855, поданої 31 березня 2010, вміст якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0172] Прикладні послідовності нуклеїнової кислоти вірусу грипу, які можуть бути вимкнені, охоплюють послідовності нуклеїнових кислот, що кодують нуклеопротеїн (NP), матричні білки (M1 і M2), неструктурні білки (NS1 і NS2), РНК-полімеразу (PA, PB1, PB2), нейрамінідазу (NA) і гемаглютинін (HA), але не обмежуються ними. Послідовності грипу А NP викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; і AY818140. Послідовності грипу А PA викладені, наприклад, у ГенБанк № AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; і AY724786. Необмежуючі приклади молекул міРНК, направлених на послідовності нуклеїнових кислот вірусу грипу, охоплюють ті, які описані в заявці на патент США № 2007/0218122, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0173] Приклади послідовностей нуклеїнових кислот вірусу гепатиту, які можуть бути вимкнені, охоплюють послідовності нуклеїнових кислот, що беруть участь в транскрипції і трансляції (наприклад, En1, En2, X, Р), і послідовності нуклеїнових кислот, що кодують структурні білки (наприклад, основні білки, у тому числі С і С-родинні білки, капсидні і білки оболонки, включаючи S, М і L білки, або їх фрагменти) (див., наприклад, Fields Virology, supra) але не обмежуються ними. Прикладні послідовності нуклеїнових кислот вірусу Гепатиту С (ВГС), які можуть бути вимкнені, включають 5'-нетранслюєму ділянку (5'-UTR), 3'-нетранслюєму ділянку (3'-UTR), поліпротеїновий кодон ділянки ініціації трансляції, послідовність внутрішнього рибосомального сайту входу (IRES), та/або послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують основний білок, білок Е1, Е2 білків, білок Р7, білок NS2, NS3 протеази/геліказу, NS4А білок, білок, NS4В, NS5А білок, та/або NS5В РНК-залежну РНК-полімеразу, але не обмежуються ними. Послідовності генома ВГС, наведені у, наприклад, ГенБанк № NC_004102 (ВГС генотипу 1а), AJ238799 (ВГС генотипу 1b), NC_009823 (ВГС генотипу 2), NC_009824 (ВГС генотипу 3), NC_009825 (ВГС генотипу 4), NC_009826 (ВГС генотипу 5), і NC_009827 (ВГС генотипу 6). Послідовності нуклеїнових кислот вірусу гепатиту А викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_001489; Послідовності нуклеїнових кислот вірусу гепатиту В, викладені, наприклад, в ГенБанк № NC_003977; Послідовності нуклеїнової кислоти вірусу Гепатиту D, викладені в, наприклад, ГенБанк № NC_001653; Послідовності нуклеїнової кислоти вірусу Гепатиту Е,

викладені, наприклад, в ГенБанк № NC_001434; і послідовності нуклеїнових кислот вірусу гепатиту G, викладені, наприклад, у ГенБанк № NC_001710. Виключення послідовностей, які кодують гени, що асоціюються з вірусною інфекцією і виживанням, зручно можуть бути використані у поєднанні з введенням звичайних засобів, що використовуються для лікування вірусного стану. Необмежуючі приклади молекул міРНК, направлених на послідовності нуклеїнових кислот вірусу гепатиту, охоплюють ті, що описані в публікації патентної заявки США № 2006/0281175, 2005/0058982, і 2007/0149470; у патенті США № 7348314; і РСТ заявці РСТ/CA2010 / 000444, озаглавленій "Композиції і способи для придушення експресії вірусу гепатиту С", поданої 19 березня 2010, що має реєстраційний номер № 020801-008910РС, описи яких включені у цей документ як посилання для всіх цілей.

[0174] Гени, що асоціюються з метаболічними захворюваннями і розладами (наприклад, розладами, в яких печінка є мішенню, і захворюваннями і розладами печінки), охоплюють, але не обмежуються ними, гени, які експресуються при дисліпідемії, такі як, наприклад, аполіпопротеїн В (АРОВ) (номер доступу в ГенБанк № NM_000384), аполіпопротеїн СIII (АРОС3) (ГенБанк реєстраційні номери №№ NM_000040 і NG_008949 REGION: 5001..8164), аполіпопротеїн Е (АРОЕ) (ГенБанк реєстраційні номер а №№ NM_000041 і NG_007084 REGION: 5001..8612), пропротеїн конвертази субтилізіна / Кенікс тип 9 (PCSK9) (номер доступу у ГенБанк № NM_174936), діацилгліцерин типа О-ацилтрансфераза 1 (DGAT1) (номер доступу в ГенБанк № NM_012079), діацилгліцерол О-ацилтрансфераза тип 2 (DGAT2) (номер доступу в ГенБанк № NM_032564), рецептори печінки X, такі як LXR α і LXR β (ГенБанк інвентарний номер № NM_007121), фарнесоїдні рецептори X (FXR) (номер доступу у ГенБанк № NM_005123), стеринний-регуляторний елемент-зв'язуючий білок (SREBP), сайт-1 протеази (S1P), 3-гідрокси-3-метилглутарил кофермент-А-редуктази (ГМГ-коензим А-редуктази); і гени експресії діабету, такі як, наприклад, глюкозо-6-фосфатази, але не обмежуючись ними (див., наприклад, Forman et al., Cell, 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol., 9:72 (1995), Zavacki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:7909 (1997); Sakai et al., Cell, 85:1037-1046 (1996); Duncan et al., J. Biol. Chem., 272:12778-12785 (1997); Willy et al., Genes Dev., 9:1033-1045 (1995); Lehmann et al., J. Biol. Chem., 272:3137-3140 (1997); Janowski et al., Nature, 383:728-731 (1996); і Peet et al., Cell, 93:693-704 (1998)).

[0175] Фахівцєві в даній області техніки буде зрозуміло, що гени, пов'язані з метаболічними захворюваннями і розладами (наприклад, захворюваннями і розладами, в яких печінка є мішенню, і захворюваннями і розладами печінки), охоплюють гени, які експресуються у самій печінці, а також і гени експресії в інших органах і тканинах. Придушення послідовностей, які кодують гени, пов'язані з метаболічними захворюваннями і розладами, зручно можуть бути використані у поєднанні з введенням звичайних засобів, що використовуються для лікування захворювань або розладів. Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують ген АРОВ, містять ті, які описані в публікації патентної заявки США № 2006/0134189, 2006/0105976 і 2007/0135372 і РСТ публікації WO 04/091515, описи яких наведені у цьому документі як посилання у повному обсязі для всіх цілей. Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують ген АРОС3, містять ті, які описані в РСТ заявці РСТ/CA2010/000120, поданій 26 січня 2010, вміст якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують ген PCSK9, містять ті, які описані в публікації заявки на патент США № 2007/0173473, 2008/0113930 і 2008/0306015, описи яких включені у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Приклади молекул міРНК, що уражують ген DGAT1 можуть бути сконструйовані з використанням антисмислових сполук, описаних у заявці на патент США № 2004/0185559, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Приклади молекул міРНК, що уражують ген DGAT2, можуть бути сконструйовані з використанням антисмислових сполук, описаних в заявці на патент США № 2005/0043524, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0176] Гени, що асоціюються з генезисом пухлин або клітинною трансформацією (наприклад, раку або інших неоплазій), охоплюють, наприклад, гени, що беруть участь в р53 убіквітинуванні, с-Jun убіквітинуванні, деацетилюванні гістонів, регуляції клітинного циклу, регуляції транскрипції, і їх комбінації. Необмежуючі приклади послідовностей генів, що асоціюються з онкогенезом або трансформацією клітин включають серин/треонін кінази, такі як ролю-подібна кіназа 1 (PLK-1) (ГенБанк, реєстраційний номер № NM_005030; Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)) і циклін-залежна кіназа 4 (CDK4) (ГенБанк, інвентарний № NM_000075); убіквітин лігази, такі як COP1 (RFWD2; ГенБанк №№ NM_022457 і NM_001001740) і ринг-бокс 1 (RBX1) (ROC1; номер доступу в ГенБанк № NM_014248); тирозинкінази, такі як WEE1 (ГенБанк № NM_003390 і NM_001143976); мітотичні кинезини, такі як Eg5 (КСП, KIF11;

номер доступу у ГенБанк № NM_004523); транскрипційні фактори, такі як фоксхед бокс M1 (FOXM1) (ГенБанк №№ NM_202002, NM_021953 і NM_202003.) і RAM2 (R1 або CDCA7L; ГенБанк №№ NM_018719, NM_001127370 і NM_001127371); інгібітори апоптозу, таких як XIAP (ГенБанк, інвентарний № NM_001167); COP9 підодиночки сигналосоми, такі як CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; номер доступу у ГенБанк № NM_006837); CSN6, CSN7A, CSN7B, і CSN8; і гістондеацетилази, такі як HDAC1, HDAC2 (номер доступу в ГенБанк № NM_001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9 і так далі.

[0177] Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують ген PLK-1, охоплюють ті, які описані в публікації заявки на патент США № 2005/0107316 і 2007/0265438; і публікації PCT № WO 09/082817, розкриття яких включене у цей опис як посилання у повному обсязі для всіх цілей. Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують гени Eg5 і XIAP охоплюють ті, які описані в заявці на патент США № 2009/0149403, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Необмежуючі приклади молекул міРНК, пригломашуючих CSN5 ген, охоплюють ті, які описані в PCT публікації WO 09/129319, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Не обмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують COP1, CSN5, RBX1, HDAC2, CDK4, WEE1, FOXM1, і RAM2 гени охоплюють ті, які описані в попередній заявці США 61/245143, поданій 23 вересня 2009, опис якої включений у цей документ як посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0178] Додаткові приклади послідовностей генів, пов'язаних з генезисом пухлин або трансформацією клітин охоплюють транслокаційні послідовності, такі як гени MLL синтезу, BCR-ABL (Wilda et al., *Oncogene*, 21:5716 (2002); Scherr et al., *Blood*, 101:1566 (2003)), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO, і AML1-MTG8 (Heidenreich et al., *Blood*, 101:3157 (2003)); надекспресовані послідовності, такі як гени множинної лікарської стійкості (Nieth et al., *FEBS Lett.*, 545:144 (2003); Wu et al., *Cancer Res.* 63:1515 (2003)), цикліни (Li et al., *Cancer Res.*, 63:3593 (2003); Zou et al., *Genes Dev.*, 16:2923 (2002)), бета-катеніни (Verma et al., *Clin Cancer Res.*, 9:1291 (2003)), гени теломерази (Kosciolek et al., *Mol Cancer Ther.*, 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, рецептори факторів зростання (див., EGFR/ErbB1 (ГенБанк реєстраційні номери №№ NM_005228, NM_201282, NM_201283, і NM_201284; см також, Nagy et al. *Exp. Cell Res.*, 285:39-49 (2003)), ErbB2/HER-2 (ГенБанк реєстраційні номери №№ NM_004448 і NM_001005862), ErbB3 (ГенБанк реєстраційні номери №№ NM_001982 і NM_001005915), і ErbB4 (ГенБанк реєстраційні номери №№ NM_005235 і NM_001042599)), і послідовності мутантів, такі як RAS (Tuschl and Borkhardt, *Mol. Interventions*, 2:158 (2002)). Необмежуючі приклади молекул міРНК, що уражують ген EGFR, охоплюють ті, які описані в заявці на патент США № 2009/0149403, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Молекули міРНК, які націлені на VEGFR гени, викладені, наприклад, у GB 2396864; Патентній заявці США № 2004/0142895; і CA 2456444, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0179] Сайленсинг послідовностей, що кодують ДНК-репаративні ферменти, знаходить застосування разом із введенням хімотерапевтичних агентів (Collis et al., *Cancer Res.*, 63:1550 (2003)). Гени, що кодують білки, пов'язані з міграцією пухлини, також уражують послідовності, що представляють інтерес, наприклад, інтегрини, селектини і металопротеїнази. Наведені приклади не є винятковими. Фахівцям у даній області техніки буде зрозуміло, що будь-яка ціла або часткова послідовність гена, який сприяє або сприяє генезису пухлин або трансформації клітин, зростанню пухлини або міграції пухлини, можуть бути включені як матрична послідовність.

[0180] Ангіогенні гени здатні сприяти формуванню нових судин. Ангіогенні гени, що представляють особливий інтерес, включають чинник зростання ендотелію судин (VEGF) (Reich et al., *Mol. Vis.*, 9:210 (2003)), плацентарний чинник зростання (PGF), VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), і тому подібне, але не обмежуючись цим. Молекули міРНК, які націлені на VEGFR гени викладені, наприклад, у GB 2396864; патентній заявці США № 2004/0142895; і CA 2456444, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0181] Гени імуномодуляторів це гени, які модулюють одну або більше імунних реакцій. Приклади генів-імуномодуляторів включають, без обмеження, фактори зростання (наприклад, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, і т.д.), інтерлейкіни (наприклад, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill et al., *J. Immunol.*, 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, і т.д.), інтерферони (наприклад, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , і т.д.), і TNF. Гени Fas і Fas-ліганда також є імуномодуляторами послідовностей-мішеней, що представляють інтерес (Song et al., *Nat. Med.*, 9:347 (2003)). Гени, що кодують молекули вторинних сигналів у кровотворних і лімфоїдних клітинах, також включені у цей винахід, наприклад, сімейство кіназ Тес, такі як тирозинкінази Брутона (Btk) (Heinonen et al., *FEBS Lett.*, 527:274 (2002)).

[0182] Гени ліганда клітинного рецептора охоплюють ліганди, які здатні зв'язуватися з рецепторами клітинної поверхні (наприклад, рецептори цитокінів, рецептори факторів зростання, рецептори з активністю тирозинкінази, рецептори, пов'язані з G-білком, рецептори інсуліну, EPO-рецептори, і так далі), для модулювання (наприклад, інгібування) фізіологічного шляху, в який включений рецептор (наприклад, проліферації клітин, канцерогенезу, трансформації клітин, митогенезі, і так далі). Необмежуючі приклади лігандів генів клітинного рецептора охоплюють цитокіни (наприклад, TNF- α , інтерферони, такі як IFN- α , IFN- β і IFN- γ , інтерлейкіни, такі як IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, хемокіни і так далі), фактори зростання (наприклад, EGF, HB-EGF, VEGF, PEDF, SDGF, bFGF, HGF, TGF- α , TGF- β , BMP1-BMP15, PDGF, IGF, NGF, β -NGF, BDNF, NT3, NT4, GDF-9, CGF, G-CSF, GM-CSF, GDF-8, EPO, TPO, і так далі), інсулін, глюкагон, ліганди рецептору, пов'язаного з G-білком і так далі.

[0183] Шаблони кодування для розширення тринуклеотидних повторів (наприклад, CAG повтору) знаходять застосування у виключенні патогенної послідовності при нейродегенеративних розладах, викликаних розширенням тринуклеотидних повторів, таких як спинобулбулярної м'язової атрофії і хвороби Хантінгтона (Caplen et al., Hum. Mol. Genet., 11:175 (2002)).

[0184] На додаток до його корисності при виключенні експресії будь-якого з вищеописаних генів у терапевтичних цілях, міРНК, описані у цьому документі, також корисні у науково-дослідних і дослідних застосуваннях, а також діагностиках, профілактичних, прогностичних, клінічних і інших галузях охорони здоров'я. Як не обмежуючий приклад, міРНК може бути використана у перевірочних дослідженнях, направлених на цільову перевірку, чи може ген, що цікавить, мати потенціал, щоб бути терапевтичною мішенню. МіРНК також можуть бути використані в ідентифікаційних дослідженнях мішеней, направлених на виявлення генів, як потенційні терапевтичні мішені.

е) Прикладні варіанти реалізації міРНК

[0185] У деяких варіантах реалізації кожен ланцюг молекули міРНК містить від близько 15 до близько 60 нуклеотидів у довжину (наприклад, близько 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, або 19-25 нуклеотидів у довжину, або 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, або 25 нуклеотидів у довжину). В одному конкретному варіанті реалізації міРНК хімічно синтезовані. Молекули міРНК за винаходом здатні вимикати експресію послідовності-мішені *in vitro* та/або *in vivo*.

[0186] В інших варіантах реалізації міРНК містить щонайменше один модифікований нуклеотид. У деяких варіантах реалізації міРНК містить один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, вісім, дев'ять, десять або більше модифікованих нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці. У конкретних варіантах реалізації, менше ніж близько 50% (наприклад, менше ніж близько 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% або 5%) нуклеотидів у дволанцюжковій області міРНК містять модифіковані нуклеотиди. У бажаних варіантах реалізації від близько 1% до близько 50% (наприклад, від близько 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 30%-40%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 25%-35%, 30%-35%, 5%-30%, 10%-30%, 15%-30%, 20%-30%, 25%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15% або 5%-10%) з нуклеотидів у дволанцюжковій ділянці міРНК містять модифіковані нуклеотиди.

[0187] В інших варіантах реалізації, міРНК містить модифіковані нуклеотиди, у тому числі 2'-О-метил (2'ОМе) нуклеотид, 2'-дезоксид-2'-фтор (2'F) нуклеотид, 2'-дезоксид нуклеотид, 2'-О-(2-метоксиетил) (МОЕ) нуклеотид, замкнуті нуклеїнові кислоти (LNA) нуклеотиди і їх суміші, але не обмежуючись ними. У бажаних варіантах реалізації цього винаходу міРНК містить 2'ОМе нуклеотид (наприклад, 2'ОМе пуринові і піримідинові нуклеотиди), такі як, наприклад, 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид, 2'ОМе-уридиновий нуклеотид, 2'ОМе-аденозиновий нуклеотид, 2'ОМе-цитозиновий нуклеотид, або їх суміші. В одному конкретному варіанті реалізації міРНК містить, щонайменше, один 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид, 2'ОМе-уридиновий нуклеотид або їх суміші. В деяких випадках, міРНК не містить 2'ОМе-цитозиновий нуклеотид. У інших варіантах реалізації міРНК містить структуру петлі шпильки.

[0188] У деяких варіантах реалізації, міРНК містить модифіковані одностанцюжкові нуклеотиди (тобто, смислові і антисмислові) або дволанцюжкові у дволанцюжковій ділянці молекули міРНК. Бажано, уридинові та/або гуанозинові нуклеотиди модифіковані в селективних позиціях у дволанцюжковій ділянці дуплексу міРНК. Що стосується модифікованих уридинових нуклеотидів, то щонайменше один, два, три, чотири, п'ять, шість або більше з нуклеотидів уридину в смисловому та/або антисмисловому ланцюзі можуть бути модифікованими

уридиновими нуклеотидами, такими як 2'ОМе-уридиновий нуклеотид. У деяких варіантах реалізації, кожен нуклеотид уридину в смисловому та/або антисмисловому ланцюзі є 2'ОМе-уридиновим нуклеотидом. Що стосується модифікованих гуанозинових нуклеотидів, то щонайменше, один, два, три, чотири, п'ять, шість або більше з нуклеотидів гуанозина в смисловому та/або антисмисловому ланцюзі можуть бути модифікованими гуанозиновими нуклеотидами, такими як гуанозин-2'ОМе нуклеотид. У деяких варіантах реалізації, кожен гуанозиновий нуклеотид у смисловому та/або антисмисловому ланцюзі є гуанозин-2'ОМе нуклеотидом.

[0189] У деяких варіантах реалізації щонайменше один, два, три, чотири, п'ять, шість, сім, або більше 5'-GU-3' фрагментів у послідовності міРНК можуть бути модифіковані, наприклад, шляхом введення неспівпадань для усунення 5'-GU-3' фрагментів та/або шляхом введення модифікованих нуклеотидів, таких як 2'ОМе нуклеотиди. 5'-GU-3' фрагмент може бути в смисловому ланцюзі, антисмисловому ланцюзі або обох ланцюгах послідовності міРНК. 5'-GU-3' фрагменти можуть бути поруч один з одним або, альтернативно, вони можуть бути розділені 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 або більше нуклеотидами.

[0190] У деяких варіантах реалізації модифікована молекула міРНК є менш імуностимулюючою, ніж відповідна немодифікована послідовність міРНК. У таких варіантах реалізації модифікована молекула міРНК із зниженими імуностимулюючими властивостями бажано зберігає іРНК активність відносно послідовності-мішені. В іншому варіанті реалізації імуностимулюючі властивості модифікованої молекули міРНК і її здатність вимикати експресію гена-мішені можуть бути збалансовані або оптимізовані шляхом введення мінімальних і селективних модифікацій 2'ОМе в послідовності міРНК, такі як, наприклад, у дволанцюжкову область дуплексу міРНК. У деяких випадках, модифікована міРНК є щонайменше на близько 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% менш імуностимулюючою, ніж відповідна немодифікована міРНК. Фахівцям у даній області техніки буде очевидно, що імуностимулюючі властивості модифікованої молекули міРНК і відповідної немодифікованої молекули міРНК, можуть бути визначені, наприклад, вимірами рівнів INF- α та/або IL-6 від близько два до близько дванадцяти годин після системного введення ссавцеві або трансфекції в клітини ссавців респондента з використанням відповідної системи доставки на основі ліпиду (наприклад, LNP системи доставки, розкритої у цьому документі).

[0191] В інших варіантах реалізації модифікована молекула міРНК має IC₅₀ (тобто половина від максимальної інгібуючої концентрації) менше або рівною десятикратній відповідній немодифікованій міРНК (тобто, модифікована міРНК має IC₅₀, яка є меншою або рівною десятикратній IC₅₀ відповідній немодифікованій міРНК). У інших варіантах реалізації модифікована міРНК має IC₅₀ менше або рівну трикратній відповідній немодифікованій послідовності міРНК. У інших варіантах реалізації модифікована міРНК має IC₅₀ менше або рівну двократній відповідній немодифікованій міРНК. Це буде очевидно фахівцям у даній області техніки, що крива доза-відповідь може бути згенерована і IC₅₀ для модифікованої міРНК і відповідною немодифікованими міРНК можуть бути легко визначені за допомогою способів, відомих фахівцям у даній області.

[0192] В іншому варіанті реалізації немодифікована або модифікована молекули міРНК здатні вимикати щонайменше близько 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% від експресії послідовності-мішені відносно негативного контролю (наприклад, лише буфер, послідовність міРНК, яка призначається іншому гену, зашифрована послідовність міРНК і так далі).

[0193] У ще одному варіанті реалізації модифікована молекула міРНК здатна вимикати щонайменше близько 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55 %, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100% від експресії послідовності-мішені відносно відповідної немодифікованої послідовності міРНК.

[0194] У деяких варіантах реалізації молекула міРНК не містить модифікованих скелетів фосфатів, наприклад, у смисловому та/або антисмисловому ланцюзі дволанцюжкової ділянки. В інших варіантах, міРНК містить один, два, три, чотири, або більше модифікованих скелетів фосфатів, наприклад, у смисловому та/або антисмисловому ланцюзі дволанцюжкової ділянки. У бажаних варіантах реалізації міРНК не містить модифікованих скелетів фосфатів.

[0195] У інших варіантах реалізації міРНК не містить 2'-дезокс нуклеотидів, наприклад, у смисловому та/або антисмисловому ланцюзі дволанцюжкової ділянки. У наступних варіантах реалізації міРНК містить один, два, три, чотири, або більше 2'-дезокс нуклеотидів, наприклад, у

смысловому та/або антисмысловому ланцюзі дволанцюжкової ділянки. У бажаних варіантах реалізації міРНК не містить 2'-дезоксинуклеотидів.

[0196] У деяких випадках, нуклеотид на 3'-кінці дволанцюжкової ділянки в смысловому та/або антисмысловому ланцюзі не є модифікованим нуклеотидом. У деяких інших випадках, нуклеотиди поблизу 3'-кінця (наприклад, в одному, двох, трьох або чотирьох нуклеотидах 3'-кінця) дволанцюжкової ділянки в смысловому та/або антисмысловому ланцюзі не є модифікованими нуклеотидами.

[0197] Молекули міРНК, описані в цьому документі, можуть мати 3' виступи з одного, двох, трьох, чотирьох або більше нуклеотидів на одній або обох сторонах дволанцюжкової ділянки, або можуть не мати виступів (тобто мають тупі кінці) на одній або з обох боків у дволанцюжковій ділянці. У деяких варіантах реалізації виступ 3' на смысловому та/або антисмысловому ланцюзі, незалежно містить один, два, три, чотири або більше модифікованих нуклеотидів, таких як 2'ОМе нуклеотиди та/або будь-якого іншого модифікованого нуклеотиду, описаних у цьому документі, або відомого в даній області.

[0198] У конкретних варіантах реалізації, міРНК вводять за допомогою системи носія, такого як нуклеїнова кислотна-ліпідна частка. У бажаному варіанті реалізації нуклеїнова кислотна-ліпідна частка містить: (а) одну або більше молекул міРНК; (б) катіонний ліпід за формулою I або його сіль; і (с) некатіонний ліпід (наприклад, DPPC, DSPC, DSPE, та/або холестерин). У деяких випадках, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка може додатково містити зв'язаний ліпід, який запобігає агрегації часток (наприклад, PEG-DAA і POZ-DAA).

2. Дайсер-субстратні дсРНК

[0199] Як використовується у цьому документі, термін "Дайсер-субстратна дсРНК" або "молекула попередника іРНК" призначений для включення будь-якої молекули-посередника, яка обробляється *in vivo* Дайсер з утворенням активної міРНК, яка включається у комплекс RISC для РНК інтерференції гена-мішені.

[0200] В одному варіанті реалізації Дайсер-субстратна дсРНК має достатню довжину для того, щоб вона оброблялася за допомогою Дайсер для одержання міРНК. Згідно цього варіанту реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК містить (i) першу послідовність олігонуклеотида (що також називається смысловим ланцюгом), який знаходиться між близько 25 і близько 60 нуклеотидів у довжину (наприклад, близько 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, або 25-30 нуклеотидів у довжину), бажано між близько 25 і близько 30 нуклеотидів у довжину (наприклад, 25, 26, 27, 28, 29 або 30 нуклеотидів у довжину) і (ii) другу послідовність олігонуклеотида (що також називається антисмысловим ланцюгом), яка гібридується з першою послідовністю в біологічних умовах, таких як умови, виявлені у цитоплазмі клітини. Друга послідовність олігонуклеотида може бути між близько 25 і близько 60 нуклеотидів у довжину (наприклад, близько 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, або 25-30 нуклеотидів у довжину), і, бажано, між близько 25 і близько 30 нуклеотидів (наприклад, 25, 26, 27, 28, 29, або 30 нуклеотидів у довжину). Крім того, область однієї з послідовностей, зокрема, антисмыслового ланцюга Дайсер-субстратної дсРНК має довжину послідовності, що дорівнює щонайменше близько 19 нуклеотидів, наприклад, від близько 19 до близько 60 нуклеотидів (наприклад, близько 19-60, 19-55, 19-50, 19-45, 19-40, 19-35, 19-30, або 19-25 нуклеотидів), бажано від близько 19 до близько 23 нуклеотидів (наприклад, 19, 20, 21, 22 або 23 нуклеотидів), які є достатньою мірою комплементарними до нуклеотидної послідовності РНК, отриманої з гена-мішені, щоб викликати реакцію іРНК.

[0201] У другому варіанті реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК має декілька властивостей, які покращують її обробку за допомогою Дайсер. Згідно цьому варіанту реалізації, дсРНК має довжину, достатню, щоб вона оброблялася Дайсер для одержання міРНК і мала щонайменше одну з наступних властивостей: (i) дсРНК є асиметричною, наприклад, має 3'-виступ на антисмысловому ланцюзі; та/або (ii) дсРНК має модифікований 3'-кінець на смысловому ланцюзі для прямої орієнтації при скріпленні Дайсер і обробленій дсРНК до активної міРНК. Відповідно до цього останнього варіанту, смысловий ланцюг містить від близько 22 до близько 28 нуклеотидів і антисмысловий ланцюг містить від близько 24 до близько 30 нуклеотидів.

[0202] У одному варіанті реалізації Дайсер-субстратна дсРНК має виступ на 3'-кінці антисмыслового ланцюга. В іншому варіанті реалізації винаходу смысловий ланцюг модифікований для зв'язування Дайсер і обробки за допомогою відповідних модифікаторів, розташованих на 3'-кінці смыслового ланцюга. Прийнятні модифікатори охоплюють нуклеотиди, такі як дезоксирибонуклеотиди, ациклонуклеотиди і тому подібні, і стерично утруднені молекули, такі як флуоресцентні молекули і тому подібне. При використанні нуклеотидних модифікаторів, вони замінюють рибонуклеотиди в дсРНК таким чином, що довжина дсРНК не змінюється. В іншому варіанті реалізації Дайсер-субстратна дсРНК має виступ на 3'-кінці антисмыслового

ланцюга і смисловий ланцюг модифікований для обробки Дайсер. У іншому варіанті реалізації, 5'-кінець смислового ланцюга має фосфат. У іншому варіанті реалізації, 5'-кінець антисмислового ланцюга має фосфат. У іншому варіанті реалізації, антисмисловий ланцюг або смисловий ланцюг, або обидва ланцюги мають одну або декілька 2'-О-метил (2'ОМе) модифікованих нуклеотидів. У іншому варіанті реалізації, антисмисловий ланцюг містить 2'ОМе модифіковані нуклеотиди. В іншому варіанті реалізації антисмисловий ланцюг містить 3'-виступ, який складається з 2'ОМе модифікованих нуклеотидів. Антисмисловий ланцюг може також містити додаткові 2'ОМе модифіковані нуклеотиди. Смислові і антисмислові ланцюги відпалюються в біологічних умовах, таких як умови, що знаходяться в цитоплазмі клітини. Крім того, ділянка однієї з послідовностей, зокрема, антисмислового ланцюга, Дайсер-субстратної дсРНК має довжину послідовності, що дорівнює щонайменше близько 19 нуклеотидів, причому ці нуклеотиди знаходяться в 21-нуклеотидній області, що примикає до 3'-кінця антисмислового ланцюга і достатньо комплементарні нуклеотидній послідовності РНК, отриманій з гена-мішені. Крім того, відповідно до цього варіанту, Дайсер-субстратна дсРНК може також мати одну або декілька з наступних додаткових властивостей: (а) антисмисловий ланцюг має зрушення праворуч від типового 21-мера (тобто, антисмисловий ланцюг містить нуклеотиди на правій частині молекули в порівнянні з типовим 21-мером); (б) ланцюги не можуть бути повністю комплементарними, тобто ланцюги можуть містити прості невідповідності спаровувань; і (с) основні модифікації, такі як блокування нуклеїнової кислоти, можуть бути включені в 5'-кінець смислового ланцюга.

[0203] У третьому варіанті реалізації, смисловий ланцюг містить від близько 25 до близько 28 нуклеотидів (наприклад, 25, 26, 27, або 28 нуклеотидів), в якому 2 нуклеотиди на 3'-кінці смислового ланцюга є дезоксирибонуклеотидами. Смисловий ланцюг містить фосфат на 5'-кінці. Антисмисловий ланцюг містить від близько 26 до близько 30 нуклеотидів (наприклад, 26, 27, 28, 29, або 30 нуклеотидів) і містить 3'-виступ з 1-4 нуклеотидів. Нуклеотиди, що містять 3'-виступ, модифіковані 2'ОМе модифікованими рибонуклеотидами. Антисмисловий ланцюг містить 2'ОМе модифіковані нуклеотиди, що чергуються, починаючи з першого мономера антисмислового ланцюга, прилеглого до 3'-виступу, і розширення 15-19 нуклеотидів від першого мономера, що прилягає до 3'-виступу. Наприклад, для 27-нуклеотидного антисмислового ланцюга і підрахунку перша основа на 5'-кінці антисмислового ланцюга у положенні номер 1, 2'ОМе модифікації буде розміщена на місці основ 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26, і 27. У одному варіанті реалізації Дайсер-субстратна дсРНК має наступну структуру:

5'-pXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'

3'-YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXp-5'

де "X" = РНК, "p" = фосфатна група, "X" = 2'ОМе РНК, "Y" є виступом домена, який складається з 1, 2, 3, 4 або РНК мономерів, які є необов'язковими 2'ОМе РНК мономерами і "D" = ДНК. Верхній ланцюг є смисловим ланцюгом, а нижній ланцюг є антисмисловим ланцюгом.

[0204] У четвертому варіанті реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК має декілька властивостей, які підвищують її обробку Дайсер. Згідно цьому варіанту реалізації, дсРНК має довжину, достатню для того, щоб вона оброблялася Дайсер для одержання міРНК і щонайменше одну з наступних властивостей: (i) дсРНК є асиметричною, наприклад, має 3'-виступ на смисловому ланцюзі; і (ii) дсРНК має модифікований 3'-кінець на антисмисловому ланцюзі, щоб направляти орієнтацію зв'язування Дайсер і обробки дсРНК до активної міРНК. Згідно цьому варіанту реалізації, смисловий ланцюг містить від близько 24 до близько 30 нуклеотидів (наприклад, 24, 25, 26, 27, 28, 29 або 30 нуклеотидів) і антисмисловий ланцюг містить від близько 22 до близько 28 нуклеотидів (наприклад, 22, 23, 24, 25, 26, 27, або 28 нуклеотидів). У одному варіанті реалізації Дайсер-субстратна дсРНК має виступ на 3'-кінці смислового ланцюга. В іншому варіанті реалізації, антисмисловий ланцюг модифікований для зв'язування Дайсер і обробки за допомогою відповідних модифікаторів, розташованих на 3'-кінці антисмислового ланцюга. Прийнятні модифікатори включають нуклеотиди, такі як дезоксирибонуклеотиди, ациклонуклеотиди і тому подібне, і стерично утруднені молекули, такі як флуоресцентні молекули і тому подібне. При використанні нуклеотидних модифікаторів, вони замінюють рибонуклеотиди у дсРНК таким чином, що довжина дсРНК не змінюється. В іншому варіанті реалізації винаходу дсРНК має виступ на 3'-кінці смислового ланцюга і антисмисловий ланцюг модифікований для обробки Дайсер. У одному варіанті реалізації, антисмисловий ланцюг має 5'-фосфат. Смислові і антисмислові ланцюги відпалюють у біологічних умовах, таких як умови, що знаходяться у цитоплазмі клітини. Крім того, ділянка однієї з послідовностей, зокрема, антисмислового ланцюга, дсРНК має довжину послідовності, що дорівнює щонайменше 19 нуклеотидам, причому ці нуклеотиди примикають до 3'-кінця антисмислового ланцюга і є у достатній мірі комплементарні нуклеотидній послідовності РНК, отриманою з гена-

мішені. Крім того, відповідно до цього варіанту реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК може також мати одну або декілька наступних додаткових властивостей: (а) антисмисловий ланцюг має ліве зрушення від типового 21-мера (тобто, антисмисловий ланцюг містить нуклеотиди по лівій частині молекули у порівнянні з типовим 21-мером); і (б) ланцюги можуть не бути повністю

5 комплементарними, тобто ланцюги можуть містити прості невідповідності спаровування.
[0205] У бажаному варіанті реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК має асиметричну структуру, із смисловим ланцюгом, що має довжину 25 пар основ, і антисмисловим ланцюгом, що має довжину 27 пар основ з 2-ма основами на 3'-виступі. В деяких випадках, ця дсРНК, що має асиметричну структуру, додатково містить 2 дезоксинуклеотида на 3'-кінці смислового ланцюга замість двох рибонуклеотидів. У деяких інших випадках, ця дсРНК, що має асиметричну структуру, додатково містить 2'ОМе модифікації у положеннях 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, і 25 антисмислового ланцюга (у якому перша основа на 5'-кінці антисмислового ланцюга знаходиться у положенні 1). У деяких додаткових випадках, ця дсРНК, що має асиметричну структуру, додатково містить 3'-виступ на антисмисловому ланцюзі, що містить 1, 2, 3 або 4 2'ОМе нуклеотидів (наприклад, 3'-виступ 2'ОМе нуклеотидів у положеннях 26 і 27 на антисмисловому ланцюзі).

[0206] У іншому варіанті реалізації, Дайсер-субстратна дсРНК може бути розроблена за допомогою початкового вибору міРНК послідовності антисмислового ланцюга, що має довжину щонайменше 19 нуклеотидів. У деяких випадках, антисмислова міРНК модифікована, щоб містити від близько 5 до близько 11 рибонуклеотидів на 5'-кінці, щоб забезпечити довжину від близько 24 до близько 30 нуклеотидів. Коли антисмисловий ланцюг має довжину 21 нуклеотид, 3-9, бажано 4-7, бажаніше 6 нуклеотидів можуть бути додані на 5'-кінець. Не дивлячись на те, що додані рибонуклеотиди можуть бути комплементарними послідовності гена-мішені, повна комплементарність між цільовою послідовністю і антисмисловою міРНК не вимагається. Тобто, у результаті антисмислового міРНК є достатньою мірою комплементарною з послідовністю-мішенню. Смисловий ланцюг, який потім виробляється, має від близько 22 до близько 28 нуклеотидів. Смисловий ланцюг, по суті, є комплементарним антисмисловому ланцюгу для відпалювання антисмислового ланцюга в біологічних умовах. У одному варіанті реалізації, смисловий ланцюг синтезується для того, щоб містити модифікований 3'-кінець і направити Дайсер обробку антисмислового ланцюга. В іншому варіанті реалізації, антисмисловий ланцюг дсРНК має 3'-виступ. У додатковому варіанті реалізації, смисловий ланцюг синтезується для того, щоб містити модифікований 3'-кінець для зв'язування і обробки Дайсер, і антисмисловий ланцюг дсРНК має 3'-виступ.

[0207] У родинному варіанті реалізації антисмислова міРНК може бути модифікована, щоб містити від близько 1 до близько 9 рибонуклеотидів на 5'-кінці для того, щоб забезпечити довжину від близько 22 до близько 28 нуклеотидів. Коли антисмисловий ланцюг має довжину у 21 нуклеотид, 1-7, бажано 2-5, бажаніше 4 рибонуклеотидів можуть бути додані на 3'-кінці. Додані рибонуклеотиди можуть мати будь-яку послідовність. Не дивлячись на те, додані рибонуклеотиди можуть бути комплементарними послідовності гена-мішені, повна комплементарність між цільовою послідовністю і антисмисловою міРНК не потрібна. Тобто, у результаті антисмислового міРНК є достатньою мірою комплементарною з послідовністю-мішенню. Смисловий ланцюг, який потім виробляється, має від близько 24 до близько 30 нуклеотидів. Смисловий ланцюг, по суті, доповнює антисмисловий ланцюг для відпалювання антисмислового ланцюга в біологічних умовах. У одному варіанті реалізації антисмисловий ланцюг, який синтезується для того, щоб містити модифікований 3'-кінець, щоб направити обробку Дайсер. У іншому варіанті реалізації смислового ланцюга дсРНК має 3'-виступ. У ще одному варіанті реалізації синтезують антисмисловий ланцюг, який містить модифікований 3'-кінець для зв'язування Дайсер і обробки, і смисловий ланцюг дсРНК має 3'-виступ.

[0208] Прийнятні Дайсер-субстратні дсРНК послідовності можуть бути визначені, синтезовані і змінені за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області для проектування, синтезу і модифікації послідовностей міРНК. У конкретних варіантах реалізації, Дайсер-субстратну дсРНК вводять за допомогою системи носія, такого як нуклеїнова кислотна-ліпідна частка. У бажаному варіанті реалізації, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка містить: (а) одну або більше Дайсер-субстратних молекул дсРНК; (б) катіонний ліпід за формулою I або його сіль; і (с) некатіонний ліпід (наприклад, DPPC, DSPC, DSPE та/або холестерин). У деяких випадках, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка може додатково містити зв'язаний ліпід, який запобігає агрегації часток (наприклад, PEG-DAA та/або POZ-DAA).

[0209] Додаткові варіанти реалізації, що відносяться до Дайсер-субстратної дсРНК згідно винаходу, а також способам проектування і синтезу таких дсРНК, описані в публікаціях патентних заявок США №№ 2005/0244858, 2005/0277610 і 2007/0265220 і попередньої заявки

США № 61/184652, поданої 5 червня 2009 року, опис яких включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

3. МшРНК

[0210] "Мала шпилька РНК" або "коротка шпилька РНК" або "мшРНК" містить коротку послідовність РНК, яка робить крутий поворот у вигляді шпильки, яка може бути використана для придушення експресії гена за допомогою РНК-інтерференції. МшРНК за винаходом можуть бути синтезовані хімічно або транскрибовані з касет транскрипцій у плазмідну ДНК. Структура шпильки мшРНК розщеплюється клітинними механізмами в міРНК, яка потім зв'язується з РНК-індукованим вимикаючим комплексом (RISC).

[0211] МшРНК за винаходом, як правило, мають близько 15-60, 15-50, 15-40 або (дуплекс) нуклеотидів, більше зазвичай близько 15-30, 15-25, 19-25 або (дуплекс) нуклеотидів у довжину, і бажано близько 20-24, 21-22, 21-23 або (дуплекс) нуклеотидів у довжину (наприклад, кожна комплементарна послідовність у дволанцюжковій мшРНК має 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, або 19-25 нуклеотидів у довжину, бажано близько 20-24, 21-22, або 21-23 нуклеотидів у довжину, і дволанцюжкова мшРНК складає близько 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, або 19-25 пар основ у довжину, бажано близько 18-22, 19-20, або 19-21 пара основ у довжину). МшРНК дуплекси можуть містити 3' виступи від близько 1 до близько 4 нуклеотидів або від близько 2 до близько 3 нуклеотидів на антисмисловому ланцюзі і 5'-фосфат-кінці на смисловому ланцюзі. У деяких варіантах реалізації цього винаходу мшРНК містить послідовності смислового ланцюга та/або антисмислового ланцюга від близько 15 до близько 60 нуклеотидів у довжину (наприклад, близько 15-60, 15-55, 15-50, 15-45, 15-40, 15-35, 15-30, або 15-25 нуклеотидів у довжину), бажано від близько 19 до близько 40 нуклеотидів у довжину (наприклад, близько 19-40, 19-35, 19-30, або 19-25 нуклеотидів в довжину), бажаніше від близько 19 до близько 23 нуклеотидів у довжину (наприклад, 19, 20, 21, 22, або 23 нуклеотидів у довжину).

[0212] Необмежуючі приклади мшРНК включають дволанцюжкову полінуклеотидну молекулу, зібрану з одноланцюжкової молекули, де смислова і антисмислова ділянки зв'язані за допомогою лінкера на основі нуклеїнової кислоти або на основі нуклеїнової кислоти; і дволанцюжкова полінуклеотидна молекула з вторинною структурою у вигляді шпильки має самокомплементарні смислову і антисмислову ділянки. У бажаних варіантах реалізації, смисловий і антисмисловий ланцюги в мшРНК зв'язані структурними петлями, що містять від близько 1 до близько 25 нуклеотидів, від близько 2 до близько 20 нуклеотидів, від близько 4 до близько 15 нуклеотидів, від близько 5 до близько 12 нуклеотидів або 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 або більше нуклеотидів.

[0213] Прийнятні послідовності мшРНК можуть бути ідентифіковані, синтезовані, і модифіковані за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області для проектування, синтезу і модифікації послідовностей міРНК. У конкретних варіантах реалізації, мшРНК вводять за допомогою системи носіїв, такої як нуклеїнова кислотна-ліпідна частка. У бажаному варіанті реалізації, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка містить: (а) одну або більше молекул мшРНК; (б) катіонний ліпід за формулою I або його сіль; і (с) некатіонний ліпід (наприклад, DPPC, DSPC, DSPE, та/або холестерин). У деяких випадках, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка може додатково містити зв'язаний ліпід, який запобігає агрегації часток (наприклад, PEG-DAA та/або POZ-DAA).

[0214] Додаткові варіанти реалізації мшРНК, що відносяться до винаходу, а також способи проектування і синтезу таких мшРНК описані в попередній заявці США 61/184652, поданій 5 червня 2009 року, опис якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

4. АіРНК

[0215] Як і міРНК, асиметрична інтерферуюча РНК (аіРНК) може утворювати РНК-індукований вимкнений комплекс (RISC) і призвести до ефективного виключення різних генів у клітинах ссавців шляхом опосередкування послідовність-специфічного розщеплювання послідовності-мішені між нуклеотидами 10 і 11 по відношенню до 5'-кінця антисмислового ланцюга (Sun et al., Nat. Biotech., 26:1379-1382 (2008)). Як правило, молекули аіРНК містять короткий РНК дуплекс, що має смисловий ланцюг і антисмисловий ланцюг, де дуплекс містить виступи на 3' і 5' кінцях антисмислового ланцюга. АіРНК, як правило, асиметричні, оскільки смисловий ланцюг коротший на обох кінцях у порівнянні з комплементарним антисмисловим ланцюгом. У деяких аспектах, аіРНК молекули можуть бути розроблені, синтезовані і відпалюватися в умовах, аналогічних тим, які використовуються для молекул міРНК. Як не обмежуючий приклад, послідовності аіРНК можуть бути вибрані і отримані з використанням способів, описаних вище для вибору послідовності міРНК.

[0216] У іншому варіанті, аіРНК дуплекси різної довжини (наприклад, близько 10-25, 12-20,

12-19, 12-18, 13-17, або 14-17 пар основ, типовіше 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, або 20 пар основ), можуть бути розроблені з виступами на 3' і 5' кінцях антисмислового ланцюга мРНК-мішені, що цікавить. У деяких випадках, смисловий ланцюг молекули аіРНК складає близько 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, або 14-17 нуклеотидів у довжину, типовіше 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, або 20 нуклеотидів у довжину. У деяких інших випадках, антисмисловий ланцюг молекули аіРНК складає близько 15-60, 15-50, або 15-40 нуклеотидів у довжину, типовіше близько 15-30, 15-25, або 19-25 нуклеотидів у довжину, і бажано близько 20-24, 21-22, або 21-23 нуклеотидів у довжину.

[0217] У деяких варіантах реалізації, 5' антисмисловий виступ містить один, два, три, чотири, або більше нуклеотида-немішені (наприклад, "AA", "UU", "dTdT", і так далі). В інших варіантах, 3' антисмисловий виступ містить один, два, три, чотири, або більше нуклеотида-немішені (наприклад, "AA", "UU", "dTdT", і так далі). У деяких аспектах, молекули аіРНК, описані в цьому документі, можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів, наприклад, у дволанцюжковій (дуплексній) ділянці та/або в антисмислових виступах. Як не обмежуючий приклад, послідовності аіРНК можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів, описаних вище для послідовностей міРНК. У бажаному варіанті молекула містить аіРНК 2'Оме нуклеотидів, таких як, наприклад, 2'Оме-гуанозинових нуклеотидів, 2'Оме-уридинових нуклеотидів або їх сумішей.

[0218] У деяких варіантах, молекули аіРНК можуть містити антисмисловий ланцюг, який відповідає антисмислового ланцюгу молекули міРНК, наприклад, одній з молекул міРНК, описаних у цьому документі. У конкретних варіантах реалізації, аіРНК вводять за допомогою системи носія, такої як нуклеїнова кислотна-ліпідна частка. У бажаному варіанті реалізації, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка містить: (а) одну або декілька молекул аіРНК; (б) катіонний ліпід за формулою I або його сіль; і (с) некатіонний ліпід (наприклад, DPPC, DSPC, DSPE, та/або холестерин). У деяких випадках, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка може додатково містити зв'язаний ліпід, який запобігає агрегації часток (наприклад, PEG-DAA та/або POZ-DAA).

[0219] Прийнятні послідовності аіРНК можуть бути ідентифіковані, синтезовані, і змінені за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області для проектування, синтезу і модифікації послідовностей міРНК. Додаткові варіанти реалізації, пов'язані з молекулами аіРНК за винаходом, описані в заявці на патент США № 2009/0291131 і РСТ публікації WO 09/127060, описи яких включені у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

5. МікроРНК

[0220] Як правило, мікроРНК (мікроРНК) є одноланцюжковими молекулами РНК, що складаються з близько 21-23 нуклеотидів у довжину, які регулюють експресію генів. МікроРНК кодуються генами ДНК, від якої вони транскрибуються, але мікроРНК не транслуються в білок (не кодуючі РНК); замість цього, кожен первинний транскрипт (прі-мікроРНК) перетворюється на коротку структуру петлі на стеблі під назвою пре-мікроРНК і, нарешті, у функціонально зрілу міРНК. Зрілі молекули мікроРНК є частково або повністю комплементарними до однієї або більше РНК (мРНК) молекулам, і їх основна функція полягає в придушенні експресії генів. Ідентифікація молекул мікроРНК описується, наприклад, у Lagos-Quintana et al., Science, 294:853-858; Lau et al., Science, 294:858-862; та Lee et al., Science, 294:862-864.

[0221] Гени, що кодують мікроРНК, є набагато довшими, ніж оброблені молекули зрілої мікроРНК. МікроРНК спочатку транскрибується як первинний транскрипт або прі-мікроРНК з кепом і полі-А хвостом і перетворюється на коротку, ~ 70-нуклеотидів структуру петлі на стеблі, відому як пре-мікроРНК у ядрі клітини. Ця обробка виконується в тваринах за допомогою білкового комплексу, відомого як комплекс Мікропроцесор, що складається з нуклеази Дроша і дволанцюжкового РНК-зв'язуючого білка Паша (Denli et al., Nature, 432:231-235 (2004)). Ці пре-мікроРНК потім перетворюються на зрілі мікроРНК у цитоплазмі шляхом взаємодії з ендонуклеазою Дайсер, яка також ініціює утворення РНК-індукованого виключення комплексу (RISC) (Bernstein et al., Nature, 409:363-366 (2001)). Обидва - і смисловий ланцюг або антисмисловий ланцюг ДНК можуть функціонувати як шаблони для збільшення кількості мікроРНК.

[0222] Коли Дайсер розщеплює петлю на стеблі пре-мікроРНК, утворюються дві комплементарні молекули РНК, але лише одна інтегрується у комплекс RISC. Цей ланцюг відомий як направляючий ланцюг і вибирається аргонавтом білка, каталітично активної РНКазою в комплексі RISC, на основі стійкості 5'-кінця (Preall et al., Curr. Biol., 16:530-535 (2006)). Решта ланцюгів, відомі як антиповідні або супроводжуючі ланцюги, розкладаються як субстратний RISC комплекс (Gregory et al., Cell, 123:631-640 (2005)). Після інтеграції в активний комплекс RISC, пари мікроРНК основ з комплементарними молекулами мРНК і викликають деградацію мРНК-мішені та/або виключення трансляції.

[0223] Молекули мікроРНК ссавців, як правило, комплементарні сайту в 3' UTR послідовності мРНК-мішені. В деяких випадках, відпалювання мікроРНК у мРНК-мішені інгібує трансляцію білка шляхом блокування організації трансляції білка. У деяких інших випадках, відпалювання мікроРНК у мікроРНК-мішені полегшує розщеплювання і деградацію мікроРНК-мішені за допомогою процесу, подібного до інтерференції РНК (іРНК). МікроРНК можуть приголомшувати метилування ділянок геномів, які відповідають мікроРНК-мішеням. Як правило, функцію мікроРНК у поєднанні з комплементом білків колективно називають мікроRNP.

[0224] У деяких аспектах, молекули мікроРНК, описані в цьому документі, мають близько 15-100, 15-90, 15-80, 15-75, 15-70, 15-60, 15-50, або 15-40 нуклеотидів у довжину, типовіше близько 15-30, 15-25, або 19-25 нуклеотидів у довжину, і бажано близько 20-24, 21-22, або 21-23 нуклеотидів у довжину. У деяких інших аспектах, молекули мікроРНК можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів. Як не обмежуючий приклад, послідовності мікроРНК можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів описаних вище послідовностей міРНК. У бажаному варіанті молекула міРНК містить 2'ОМе нуклеотиди, такі як, наприклад, 2'ОМе-гуанозиновий нуклеотид, 2'ОМе-уридиновий нуклеотид або їх суміші.

[0225] У конкретних варіантах реалізації, мікроРНК вводять за допомогою системи носіїв, такий як нуклеїнова кислотна-ліпідна частка. У бажаному варіанті реалізації, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка містить: (а) одну або більше молекул мікроРНК; (б) катіонний ліпід за формулою I або його сіль; і (с) некатіонний ліпід (наприклад, DPPC, DSPC, DSPE, та/або холестерин). У деяких випадках, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка може додатково містити зв'язаний ліпід, який запобігає агрегації часток (наприклад, PEG-DAA та/або POZ-DAA).

[0226] У інших варіантах, один або декілька агентами, які блокують активність у мікроРНК-мішенях мРНК, що цікавлять, вводять із використанням ліпідної частки за винаходом (наприклад, нуклеїнова кислотна-ліпідна частка, така як LNP). Приклади блокуючих агентів охоплюють стеричні блокуючі олігонуклеотиди, закриті олігонуклеотиди нуклеїнових кислот і морфоліно олігонуклеотиди, але не обмежуються ними. Такі блокуючі агенти можуть зв'язуватися безпосередньо з мікроРНК або з сайтом зв'язування мікроРНК на мРНК-мішені.

[0227] Додаткові варіанти реалізації, пов'язані з молекулою мікроРНК за винаходом, описані у заявці на патент США № 2009/0291131 і РСТ публікації WO 09/127060, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

6. Безсмыслові олігонуклеотиди

[0228] У одному варіанті реалізації нуклеїнова кислота є антисмысловим олігонуклеотидом, що вражає ген-мішень або послідовність, що цікавить. Терміни "антисмысловий олігонуклеотид" або "антисмысловий" охоплюють олігонуклеотиди, комплементарні мішені - полінуклеотидній послідовності. Антисмыслові олігонуклеотиди представлені одинокланцюжковими ДНК або РНК, які комплементарні до вибраної послідовності. Антисмыслові РНК олігонуклеотиди запобігають трансляції комплементарних ланцюгів РНК шляхом зв'язування з РНК. Антисмыслові олігонуклеотиди ДНК можуть використовуватися для ураження специфічної, комплементарної (кодуючої або некодуючої) РНК. Якщо відбувається зв'язування, цей ДНК/РНК гібрид може бути деградований за допомогою ферменту РНКазы Н. У конкретному варіанті реалізації, антисмыслові олігонуклеотиди містять від близько 10 до близько 60 нуклеотидів, бажаніше від близько 15 до близько 30 нуклеотидів. Термін також охоплює антисмыслові нуклеотиди, які не можуть бути точно комплементарними бажаному гену-мішені. Таким чином, винахід може бути використаний у тих випадках, коли не-мішенні неспецифічні активності виявлені антисмысловими, або там, де антисмыслова послідовність, що містить одну або декілька неспівпадань з послідовністю-мішенню, є найбільше бажаною для конкретного використання.

[0229] Антисмыслові олігонуклеотиди були продемонстровані як ефективні і уражують інгібітори синтезу білка, і, отже, можуть бути використані для специфічного інгібування синтезу білка гена-мішені. Ефективність антисмыслових олігонуклеотидів для інгібування синтезу білка добре відома. Наприклад, синтез полігалактоуринази і ацетилхолінового рецептора мускарину типу 2 пригнічуються антисмысловими олігонуклеотидами, направленими на їх відповідні послідовності мРНК (див. патенти США №№ 5739119 і 5759829). Крім того, приклади антисмыслого інгібування були продемонстровані з ядерним білком цикліном, геном множинної лікарської стійкості (MDR1), ICAM-1, Е-селекція, STK-1, рецептором стріарного GABA_A, і людського EGF (див. Jaskulski et al., Science, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar et al., Cancer Commun., 1:225-32 (1989); Peris et al., Brain Res Mol Brain Res., 15:57:310-20 (1998); і патентах США №№ 5801154; 5789573; 5718709 і 5610288). Крім того, також були описані антисмыслові конструкції, що інгібують і можуть бути використані для лікування різних патологічних клітинних розростань, наприклад, раку (див. патенти США №№ 5747470; 5591317 і 5783683). Розкриття цих посилань включені у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для

всіх цілей.

[0230] Способи одержання антисмислових олігонуклеотидів відомі у даній області і можуть бути легко адаптовані для одержання антисмислових олігонуклеотидів, які вражають будь-яку поліонуклеотидну послідовність. Вибір антисмислової олігонуклеотидної послідовності, специфічної для даної послідовності-мішені, оснований на аналізі вибраної послідовності-мішені і визначення вторинної структури, T_m , енергії зв'язування і відносної стабільності. Антисмислові олігонуклеотиди можуть бути вибрані на основі їх відносної нездатності утворювати димери, шпильки або інші вторинні структури, які дозволили б зменшити або заборонити специфічне зв'язування з мРНК-мішенню в клітині-господарі. Найбільше бажані цільові ділянки мРНК охоплюють ті ділянки на або поблизу кодону ініціації трансляції AUG і ті послідовності, які істотно комплементарні 5' ділянці мРНК. Аналіз цих вторинних структур і вибір сайту-мішені можуть бути виконані, наприклад, за допомогою v.4 програмного забезпечення для аналізу праймера OLIGO (Молекулярні Біологічні Інсайти) та/або програмного забезпечення алгоритму BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997)).

7. Рибозими

[0231] Відповідно до іншого варіанту реалізації цього винаходу, нуклеїнові кислотні-ліпідні частки пов'язані з рибозимами. Рибозими є РНК-білковими комплексами, що мають конкретні каталітичні домени, які мають активність ендонуклеаз (див., Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:8788-92 (1987); і Forster et al., *Cell*, 49:211-20 (1987)). Наприклад, велика кількість рибозимів прискорює реакцію передачі фосфоефірів з високою мірою специфічності, часто розщеплюючи лише один з декількох фосфоефірів в олігонуклеотидному субстраті (див. Cech et al., *Cell*, 27:487-96 (1981); Michel et al., *J. Mol. Biol.*, 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek et al., *Nature*, 357:173-6 (1992)). Ця специфіка була приписана до вимоги, що субстрат зв'язується через специфічну взаємодію по спаровуванню основ на внутрішній провідній послідовності ("IGS") рибозима заздалегідь до протікання хімічної реакції.

[0232] Щонайменше шість основних сортів ферментативних молекул РНК відомі у природі у наш час. Кожна з них може каталізувати гідроліз РНК фосфодіефірних зв'язків *in trans* (і, отже, може розщеплювати інші молекули РНК) у фізіологічних умовах. Загалом, ферментні нуклеїнові кислоти діють за допомогою первинного зв'язування з РНК-мішенню. Таке зв'язування відбувається через мішень-зв'язуючу ділянку ферментативної нуклеїнової кислоти, яка проходить у безпосередній близькості від ферментативної частини молекули, яка діє за допомогою розщеплювання РНК-мішені. Таким чином, ферментативна нуклеїнова кислота спершу визначає, а потім зв'язує РНК-мішені за допомогою комплементарного спаровування основ, і як тільки вона зв'язана з правильним сайтом, діє за допомогою ферментативного розщеплювання РНК-мішені. Стратегічне розщеплювання такої РНК-мішені знищить її здатність направляти синтез закодованого білка. Після того, як ферментативна нуклеїнова кислота зв'язала і розщепила РНК-мішень, вона звільняється від цієї РНК і шукає іншу ціль і може неодноразово зв'язувати і розщеплювати нові цілі.

[0233] Ферментативна молекула нуклеїнової кислоти може бути сформована в молот, шпильку, вірус гепатиту δ, інтрон групи I або РНПази РНК (у поєднанні з направляючою послідовністю РНК) або Нейроспора проти РНК фрагмент, наприклад. Конкретні приклади фрагментів молотка описані, наприклад, у Rossi et al., *Nucleic Acids Res.*, 20:4559-65 (1992). Приклади фрагментів шпильки описані, наприклад, в EP 0360257, Hampel et al., *Biochemistry*, 28:4929-33 (1989); Hampel et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:299-304 (1990); і патенті США № 5,631,359. Приклад фрагмента вірусу гепатиту δ описаний, наприклад, у Perrotta et al., *Biochemistry*, 31:11843-52 (1992). Приклад фрагмента РНПази описаний, наприклад, у Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35:849-57 (1983). Приклади Нейроспора проти РНК рибозимного фрагмента описані у, наприклад, Saville et al., *Cell*, 61:685-96 (1990); Saville et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8826-30 (1991); Collins et al., *Biochemistry*, 32:2795-9 (1993). Приклад групи I інтрону описаний, наприклад, у патенті США № 4987071. Важливими характеристиками ферментативних молекул нуклеїнових кислот, що використовуються відповідно до цього винаходу є те, що вони мають специфічний субстратний сайт зв'язування, комплементарний до однієї або більше ділянкам гена-мішені ДНК або РНК, і що вони мають нуклеотидні послідовності, в межах або оточуючі сайт субстратного зв'язування, які додає РНК розщеплюючу активність до молекули. Таким чином, рибозимні конструкції не повинні обмежуватися конкретними фрагментами, згаданими у цьому документі. Розкриття цих посилань включені у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0234] Способи одержання рибозимів, що уражають будь-яку поліонуклеотидну послідовність, відомі у даній області. Рибозими можуть бути сконструйовані, як описано, наприклад, у публікації РСТ №№ WO 93/23569 і WO 94/02595, і синтезовані, аби бути випробуваними *in vitro* та/або *in*

vivo, як описано у ній. Розкриття цих публікацій РСТ включені у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0235] Активність рибозимів можна оптимізувати, змінюючи довжину рибозимних ділянок зв'язування або хімічним синтезом рибозимів із змінами, які запобігають їх деградації у сироватці рибонуклеази (див., наприклад, в публікації РСТ №№ WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162 і WO 94/13688, EP 92110298,4, і в патенті США № 5334711, які описують різні хімічні модифікації, які можуть бути зроблені з цукровими фрагментами ферментативних молекул РНК, розкриття яких наведені у цьому документі шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей), модифікації, які збільшують їх ефективність у клітинах, і видалення ствольних основ II для скорочення часу синтезу РНК і зменшення потреби в хімічних речовинах.

8. Імуностимулюючі олігонуклеотиди

[0236] Нуклеїнові кислоти, пов'язані з ліпідними частками за цим винаходом, можуть бути імуностимулюючими, у тому числі імуностимулюючими олігонуклеотидами (ISS; одно- або дволанцюжковими), здатними індукувати імунну відповідь при введенні суб'єктові, який може бути, наприклад, ссавцем, таким як людина. ISS охоплюють, наприклад, визначені палиндрами, що призводять до утворення шпильки вторинних структур (див., Yamamoto et al., J. Immunol., 148:4072-6 (1992)), або CpG фрагменти, а також інші відомі особливості ISS (такі як мульти-G домени, див. РСТ публікацію WO 96/11266, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей).

[0237] Імуностимулюючі нуклеїнові кислоти, як вважають, є неспецифічними послідовностями, коли не потрібно, щоб вони специфічно зв'язувалися з і знижували експресію послідовності-мішені, щоб спровокувати імунну реакцію. Таким чином, визначені імуностимулюючі нуклеїнові кислоти можуть містити послідовності, що відповідають ділянці з природним геном або мРНК, але вони все ж таки можуть бути розглянуті як неспецифічні послідовності імуностимулюючих нуклеїнових кислот.

[0238] У одному варіанті реалізації імуностимулююча нуклеїнова кислота або олігонуклеотид містить щонайменше один динуклеотид CpG. Олігонуклеотид або CpG динуклеотид може бути неметилуваним або метилуваним. У іншому варіанті реалізації імуностимулююча нуклеїнова кислота містить щонайменше один динуклеотид CpG, що має метилований цитозин. У одному варіанті реалізації нуклеїнова кислота містить один динуклеотид CpG, в якому цитозин у динуклеотиді CpG є метилованим. У альтернативному варіанті реалізації нуклеїнова кислота містить щонайменше два динуклеотиди CpG, в яких щонайменше один цитозин у динуклеотиді CpG метилований. У додатковому варіанті реалізації кожен цитозин у динуклеотиді CpG, що присутній у послідовності, метилований. У іншому варіанті реалізації нуклеїнова кислота містить множинну CpG динуклеотидів, в якій щонайменше один з динуклеотидів CpG містить метилований цитозин. Приклади імуностимулюючих олігонуклеотидів, придатних для використання в композиціях і способах за цим винаходом, описані в публікації РСТ WO №№ 02/069369, WO 01/15726 і WO 09/086558; у патенті США № 6406705; і в Raney et al., J. Pharm. Exper. Ther., 298:1185-92 (2001), вміст яких включений у цей опис як посилання у повному обсязі для всіх цілей. У деяких варіантах реалізації, олігонуклеотиди, що використовуються в композиціях і способах за цим винаходом, мають фосфодіефірну ("PO") основу або фосфортіоатну ("PS") основу, та/або щонайменше один метилований цитозиновий залишок у фрагменті CpG.

В. Інші активні агенти

[0239] У деяких варіантах реалізації активний агент, зв'язаний з ліпідними частками згідно винаходу може містити один або більше терапевтичних білків, поліпептидів або малих органічних молекул або сполук. Не обмежуючі приклади таких терапевтично ефективних агентів або ліків охоплюють онкологічні препарати (наприклад, хіміотерапевтичні препарати, гормональні терапевтичні агенти, імунотерапевтичні агенти, рентгенотерапевтичні агенти і так далі), гіполіпідемічні засоби, противірусні препарати, протизапальні сполуки, антидепресанти, стимулятори, анальгетики, антибіотики, протизапальні препарати, жарознижуючі засоби, судинорозширювальні засоби, анти-ангіогени, цитоваскулярні агенти, інгібітори сигнальної трансдукції, серцево-судинні препарати, такі як антиаритмічні агенти, гормони, судинозвужувальні і стероїди. Ці активні речовини можуть бути введені окремо в ліпідну частку за цим винаходом, або в комбінації (наприклад, такі, що спільно вводиться) з ліпідними частками згідно винаходу, що містять нуклеїнову кислоту, таку як інтерферуюча РНК.

[0240] Не обмежуючі приклади хіміотерапевтичних препаратів охоплюють препарати на основі платини (наприклад, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, спіроплатин, іпроплатин, сатраплатин і так далі), алкілюючі агенти (наприклад, циклофосфамід, іфосфамід, хлорамбуцил, бусульфан, мелфалан, мехлоретамін, урамустин, тіотепа, нітрозомочевини, і так далі),

антиметаболіти (наприклад, 5-фторурацил (5-ФУ), азатіоприн, метотрексат, лейковорин, капецитабін, цитарабін, флоксурин, флударабін, гемцитабін, пеметрексед, ралтитрексед, і так далі), рослинні алкалоїди (наприклад, вінкристин, вінбластин, вінорелбін, віндезин, подофіллотоксин, паклітаксел (таксол), доцетаксел, і так далі), інгібітори топоізомерази (наприклад, іринотекан (CPT-11; Камптосар), топотекан, амсакрин, етопозид (VP16), етопозид фосфат, теніпозид, і так далі), протипухлинні антибіотики (наприклад, доксорубіцин, адриаміцин, даунорубіцин, епирубіцин, актиноміцин, блеомицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин і так далі), тирозин кінази (наприклад, гефітініб (Iressa®), сунітиніб (Sutent®, SU11248), ерлотиніб (Tarceva®, OSI-1774), лапатиніб (GW572016; GW2016), канертиніб (CI 1033), семаксиніб (SU5416), ваталаніб (PTK787 / ZK222584), сорафеніб (BAY 43-9006), іматиніб (Gleevec®, STI571), дазатиніб (BMS-354825), лефлуномід (SU101), вандетаміб (Zactima™; ZD6474), і так далі), їх фармацевтично прийнятні солі, їх стереоізомери, їх похідні, їх аналоги, а також їх комбінації.

[0241] Приклади традиційних гормональних терапевтичних агентів охоплюють, без обмеження, стероїди (наприклад, дексаметазон), фінастерид, інгібітори ароматази, тамоксифен, і гозерелін, а також інші агоністи гонадотропін-вивільняючого гормону (GnRH).

[0242] Приклади традиційних імунотерапевтичних агентів охоплюють імуностимулятори (наприклад, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), левамизол, інтерлейкін-2, альфа-інтерферон і так далі), моноклональні антитіла (наприклад, анти-CD20, анти-HER2, анти-CD52, анти-HLA-DR, і анти-VEGF моноклональні антитіла), імунотоксини (наприклад, анти-CD33 моноклональне антитіло, кон'югат -каліхеаміцин, анти-CD22 моноклональне антитіло-екзотоксин *Pseudomonas* кон'югат, і так далі), і радіоімунотерапія (наприклад, анти-CD20 моноклональне антитіло, кон'юговане з ^{111}In , ^{90}Y , або ^{131}I , і так далі), але не обмежуючись ними).

[0243] Приклади традиційних радіотерапевтичних агентів охоплюють радіонукліди, такі як ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , і ^{212}Bi , можливо, кон'юговані з антитілами, направленими проти пухлинних антигенів, але не обмежуються ними.

[0244] Додаткові онкологічні препарати, які можуть бути використані відповідно до винаходу, включають алкеран, алопуринол, альтретамін, амифостин, анастрозол, агаС, триоксид миш'яку, бексаротен, бісCNU, кармустин, CCNU, целекоксиб, кладрибін, циклоспорин А, цитозинарабінозид, цитоксан, дексразоксан, DTIC, естрамустин, ексеместан, FK506, гемтузумаб-озогаміцин, гедреа, гідроксісечовину, ідарубіцин, інтерферон, летрозол, леустатин, леупролід, літретиноїн, мегастрол, L-PAM, месна, метоксален, мітраміцин, азот гірчиці, памідронат, пегадемаз, пентостатин, натрій порфімер, преднізолон, ритуксан, стрептозоцин, STI-571, таксотером, темозоламід, VM-26, тореміфен, третиноїн, ATRA, валрубіцин, і велбан, але не обмежуються ними. Інші приклади онкологічних препаратів, які можуть бути використані відповідно до винаходу, представлені еліптицином і аналогами або похідними еліптицина, епотилоном, внутрішньоклітинними інгібіторами кіназ, і камптотецином.

[0245] Необмежуючі приклади гіполіпідемічних агентів для лікування ліпідного захворювання або розладу, пов'язаного з підвищеними тригліцеридами, холестеринном, та/або глюкозою, включають статини, фібрати, езетиміби, тiazолідиндіони, ніацин, бета-блокатори, нітрогліцерини, антагоністи кальцію, риб'ячий жир і їх суміші.

[0246] Приклади противірусних препаратів охоплюють, але не обмежуються ними, абакавір, ацикловір, ацикловір, адефовір, амантадин, ампренавір, арбідол, атазанавір, атрипла, сидофовір, комбівір, дарунавір, делавірдин, диданозин, дококанол, едоксудин, ефавіренц, емтрицитабін, енфувіртид, ентекавір, інгібітори введення, фамцикловір, фіксовані дози комбінованих препаратів, фомівірсен, фосампренавір, фоскарнет, фосфонет, інгібітори злиття, ганцикловір, ібацитабін, імуновір, ідоксуридин, іміквімод, індинавір, інозин, інгібітори інтегрази, інтерферон типу III (наприклад, молекули IFN- λ , такі як IFN- λ 1, IFN- λ 2 і IFN- λ 3), інтерферон типу II (наприклад, IFN- γ), інтерферон типу I (наприклад, IFN- α , такий, як пегільований IFN- α , IFN- β , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- ω , і IFN- ζ), інтерферон, ламівудин, лопінавір, ловірид, МК-0518, маравірок, мороксидин, нелфінавір, невірапін, нексавір, аналоги нуклеозида, осельтамівір, пенцикловір, перамівір, плеконарил, подофіллотоксин, інгібітори протеази, інгібітори зворотної транскриптази, рибавірин, римантадин, ритонавір, саквінавір, ставудин, синергетичні підсилювачі, тенофовір, дизопроксил, типранавір, трифлуридин, тризівір, тромантадин, трувада, валацикловір, валганцикловір, викривірок, видарабін, вірамідин, зальцитабін, занамівір, зидовудин, його фармацевтично прийнятні солі, їх стереоізомери, їх похідні, їх аналоги і їх суміші.

V. Ліпідні частки

[0247] У деяких аспектах цей винахід забезпечує ліпідні частки, що містять один або більше

з катіонних (аміно) ліпідів або їх солей, описаних у цьому документі. У деяких варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом додатково містять один або більше некатіонних ліпідів. У інших варіантах реалізації ліпідні частки додатково містять один або більше кон'югованих ліпідів, здатних знижувати або інгібувати агрегацію часток. У додаткових варіантах реалізації ліпідні частки додатково містять один або більше активних агентів або терапевтичних агентів, таких як терапевтичні нуклеїнові кислоти (наприклад, інтерферуючі РНК, такі як міРНК).

[0248] Ліпідні частки містять ліпідні бульбашки, такі як ліпосоми, але не обмежуються ними. Як використовується у цьому документі, ліпідні бульбашки містять структуру, що містить ліпідні мембрани, що захищають від водного середовища. У конкретних варіантах реалізації, ліпідні бульбашки, що містять один або більше з катіонних ліпідів, описаних у цьому документі, використовуються для інкапсуляції нуклеїнових кислот у межах ліпідних везикул. У інших варіантах реалізації, ліпідні бульбашки, що містять один або більше з катіонних ліпідів, описаних у цьому документі, в комплексі з нуклеїновими кислотами утворюють ліпоплекси.

[0249] Ліпідні частки за цим винаходом зазвичай містять активну речовину або терапевтичний агент, катіонний ліпід, некатіонний ліпід і зв'язаний ліпід, який інгібує агрегацію часток. У деяких варіантах реалізації активна речовина або терапевтичний агент повністю інкапсулюються у ліпідній частині ліпідної частки таким чином, що активний агент або терапевтичний засіб у ліпідній частці є стійким у водному розчині, до ферментативного розкладання, наприклад, нуклеазою або протеазою. В інших варіантах реалізації ліпідні частки, описані у цьому документі, є по суті нетоксичними для ссавців, таких як люди. Ліпідні частки за цим винаходом зазвичай мають середній діаметр від близько 30 нм до близько 150 нм, від близько 40 нм до близько 150 нм, від близько 50 нм до близько 150 нм, від близько 60 нм до близько 130 нм, від близько 70 нм до близько 110 нм, або від близько 70 до близько 90 нм. Ліпідні частки за винаходом також зазвичай мають співвідношення ліпід:терапевтичний агент (наприклад, ліпід:нуклеїнова кислота) (мас./мас. співвідношення) від близько 1:1 до близько 100:1, від близько 1:1 до близько 50:1, від близько 2:1 до близько 25:1, від близько 3:1 до близько 20:1, від близько 5:1 до близько 15:1, або від близько 5:1 до близько 10:1.

[0250] У бажаних варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом є сироватко-стабільними нуклеїновими кислотно-ліпідними частками (LNP), що містять інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК, Дайсер-субстратну дсРНК, мшРНК, аіРНК, та/або мікроРНК), катіонний ліпід (наприклад, один або більше катіонний ліпід за формулою I або їх солей, викладеними у цьому документі), некатіонний ліпід (наприклад, суміші одного або більше фосфоліпідів і холестерина), і кон'югований ліпід, який інгібує агрегацію частки (наприклад, один або більше PEG-ліпідні та/або POZ-ліпідні кон'югати). LNP може містити, щонайменше, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше немодифікованих та/або модифікованих молекул інтерферуючих РНК. Нуклеїнові кислотно-ліпідні частки і спосіб їх одержання описані, наприклад, у патентах США №№ 5753613; 5785992; 5705385; 5976567; 5981501; 6110745; і 6320017 і публікації РСТ номер WO 96/40964, описи яких кожен включений сюди шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0251] У нуклеїнових кислотно-ліпідних частках за цим винаходом нуклеїнова кислота може бути повністю інкапсульована в ліпідну частину частки, тим самим захищаючи нуклеїнову кислоту від деградації нуклеазою. У бажаних варіантах реалізації LNP, що містить нуклеїнову кислоту, таку як інтерферуючі РНК, повністю інкапсульована в ліпідній частині частки, тим самим захищаючи нуклеїнову кислоту від розкладання нуклеазою. У деяких випадках, нуклеїнова кислота в LNP по суті не розкладається після дії на частку нуклеази при 37°C протягом щонайменше близько 20, 30, 45 або 60 хвилин. У деяких інших випадках, нуклеїнова кислота в LNP по суті не деградується після інкубації частки в сироватці при 37°C протягом щонайменше близько 30, 45 або 60 хвилин або щонайменше близько 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 або 36 годин. У інших варіантах реалізації нуклеїнова кислота утворює комплекс з ліпідною частиною частки. Однією з переваг композицій за цим винаходом є те, що нуклеїнові кислотно-ліпідні частки, по суті, не токсичні для ссавців, таких як люди.

[0252] Термін «повністю інкапсульована» вказує на те, що нуклеїнова кислота в нуклеїновій кислотно-ліпідній частці істотно не розкладається після аналізу контакту з сироваткою або нуклеазою, яка істотно розкладає вільну ДНК або РНК. У повністю інкапсульовані системи, бажано менше ніж близько 25% від нуклеїнової кислоти у частці розкладається при лікуванні, що, як правило, розкладається 100% вільної нуклеїнової кислоти, бажаніше менше ніж близько 10%, і найбажаніше менше ніж близько 5 % від нуклеїнової кислоти в частці розкладається. "Герметичне" також вказує на те, що нуклеїнові кислотно-ліпідні частки у сироватці крові є стабільними, тобто, що вони не швидко розкладаються на складові частини при введенні *in vivo*.

[0253] У контексті нуклеїнових кислот, повна інкапсуляція може бути визначена виконанням

аналізу непроникності мембрани для флуоресцентного барвника, який використовує барвник, що має підвищену флуоресценцію при зв'язуванні з нуклеїновою кислотою. Конкретні барвники, такі як OliGreen® і RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) доступні для кількісного визначення ДНК плазмід, одностанцюжкових дезоксирибонуклеотидів, та/або одно- або двостанцюжкових рибонуклеотидів. Інкапсуляція визначається шляхом додавання барвника в ліпосомну композицію, виміри флуоресценції, і порівнянням її із спостережуваною флуоресценцією при додаванні невеликої кількості неіоногенного детергента. Детергент-опосередковане порушення ліпосомального бішару звільняє інкапсульовану нуклеїнову кислоту, що дозволяє йому взаємодіяти з мембраною, непроникною для фарби. Інкапсуляція нуклеїнової кислоти може бути розрахована як $E = (I_o - I)/I_o$, де I і I_o відносяться до інтенсивності флуоресценції до і після додавання детергента (див., Wheeler et al., Gene Ther., 6:271-281 (1999)).

[0254] У інших варіантах реалізації цей винахід відноситься до композиції нуклеїнової кислотно-ліпідної частки (наприклад, LNP), що містить множину нуклеїнових кислотно-ліпідних часток.

[0255] У деяких випадках, LNP композиція, що містить нуклеїнову кислоту, повністю інкапсульована у ліпідну частину часток, таких, що від близько 30% до близько 100%, від близько 40% до близько 100%, від близько 50% до близько 100%, від близько 60% до близько 100%, від близько 70% до близько 100%, від близько 80% до близько 100%, від близько 90% до близько 100%, від близько 30% до близько 95%, від близько 40% до близько 95%, від близько 50% до близько 95%, від близько 60% до близько 95%, від близько 70% до близько 95%, від близько 80% до близько 95%, близько від 85% до близько 95%, від близько 90% до близько 95%, від близько 30% до близько 90%, від близько 40% до близько 90%, від близько 50% до близько 90%, від близько 60% до близько 90%, від близько 70% до близько 90%, від близько 80% до близько 90%, або щонайменше близько 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) часток мають нуклеїнову кислоту, інкапсульовану всередині них.

[0256] У інших випадках, LNP композиція містить нуклеїнову кислоту, повністю інкапсульовану у ліпідну частину часток, таку, що від близько 30% до близько 100%, від близько 40% до близько 100%, від близько 50% до близько 100%, від близько 60% до близько 100%, від близько 70% до близько 100%, від близько 80% до близько 100%, від близько 90% до близько 100%, від близько 30% до близько 95%, від близько 40% до близько 95%, від близько 50% до близько 95%, від близько 60% до близько 95%, від близько 70% до близько 95%, від близько 80% до близько 95%, близько від 85% до близько 95%, від близько 90% до близько 95%, від близько 30% до близько 90%, від близько 40% до близько 90%, від близько 50% до близько 90%, від близько 60% до близько 90%, від близько 70% до близько 90%, від близько 80% до близько 90%, або щонайменше близько 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% або 99% (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) нуклеїнової кислоти, що вноситься, інкапсулюється у частках.

[0257] Залежно від передбачуваного використання ліпідних часток за цим винаходом, пропорції компонентів можна змінювати, і ефективність доставки конкретної композиції може бути виміряна за допомогою, наприклад, аналізу параметра ендосомального вивільнення (ERP).

[0258] У конкретних варіантах реалізації цей винахід відноситься до композиції ліпідної частки (наприклад, LNP), що містить множину ліпідних часток, описаних у цьому документі, і антиоксиданти. В деяких випадках, антиоксиданти у складі ліпідних часток зменшують, запобігають та/або інгібують розкладання катіонного ліпиду, присутнього у ліпідній частці. У випадках, коли активний агент є терапевтичною нуклеїновою кислотою, такою як інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК), антиоксидант у ліпідній частці композиції зменшує, запобігає та/або інгібуює розкладання корисного навантаження нуклеїнової кислоти, наприклад, за рахунок скорочення, запобігання та/або інгібування утворення аддуктів між нуклеїновою кислотою і катіонним ліпідом. Необмежуючі приклади антиоксидантів охоплюють гідрофільні антиоксиданти, такі як хелатуючі агенти (наприклад, хелати металів, такі як етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA), цитрат і тому подібне), ліпофільні антиоксиданти (наприклад, ізомери вітаміну Е, поліфеноли, і тому подібне), їх солі; і їх суміші. Якщо необхідно, антиоксидант, як правило, присутній у кількості, достатній для того, щоб запобігти, інгібування та/або зменшити розкладання катіонного ліпиду та/або справжнього активного агента у частці, наприклад, щонайменше близько 20 мМ EDTA, або її сіль, або щонайменше близько 100 мМ цитрату, або його солі. Антиоксидант, такий як EDTA і цитрат, може бути включений на будь-якій стадії або у декілька етапів у процесі формування часток ліпідів, описаних у розділі VI

(наприклад, до, під час і після формування ліпідної частки).

[0259] Додаткові варіанти реалізації, пов'язані з методами запобігання деградації катіонних ліпідів та/або активних агентів (наприклад, терапевтичних нуклеїнових кислот), присутні у ліпідних частках, композиціях, що містять ліпідні частки, стабілізовані за допомогою цих способів, способи одержання цих часток ліпідів і способи доставки та/або введенні цих ліпідних часток описані в міжнародній заявці РСТ/CA2010/001919, що називається "SNALP композиції, що містять антиоксиданти", поданій 1 грудня 2010 року, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

А. Катіонні ліпіди

[0260] Будь-який з нових катіонних ліпідів за формулою I або його солі, викладені в цьому документі, можуть бути використані в ліпідних частках за цим винаходом (наприклад, LNP), окремо або в комбінації з одним або декількома іншими видами катіонних ліпідів або видами некатіонних ліпідів.

[0261] Інші катіонні ліпіди або їх солі, які також можуть бути включені в ліпідні частки за цим винаходом, охоплюють 1,2-ділінолеїлокси-N,N-диметиламінопропан (DLinDMA), 1,2-діліноленілокси-N,N-диметиламінопропан (DLenDMA), 1,2-ди-γ-ліноленілокси-N,N-диметиламінопропан (γ-DLenDMA), 1,2-ділінолеїлокси-(N,N-диметил)-бутил-4-амін (C2-DLinDMA), 1,2-ділінолеїлокси-(N,N-диметил)-бутил-4-амін (C2-DLinDAP), 2,2-ділінолеїл-4-(2-диметиламіноетил)-[1,3]-діоксалан (DLin-K-C2-DMA; також відомі як "XTC2" або "C2K"), 2,2-ділінолеїл-4-(3-диметиламінопропіл)-[1,3]-діоксалан (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-ділінолеїл-4-(4-диметиламінобутил)-[1,3]-діоксалан (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-ділінолеїл-5-диметиламінометил-[1,3]-діоксан (DLin-K6-DMA), 2,2-ділінолеїл-4-N-метилпепіазин-[1,3]-діоксалан (DLin-K-MPZ), 2,2-ділінолеїл-4-диметиламінометил-[1,3]-діоксалан (DLin-K-DMA), 2,2-діолеїл-4-диметиламінометил-[1,3]-діоксалан (DO-K-DMA), 2,2-дистеароїл-4-диметиламінометил-[1,3]-діоксалан (DS-K-DMA), 2,2-ділінолеїл-4-N-морфоліно-[1,3]-діоксалан (DLin-K-MA), 2,2-ділінолеїл-4-триметиламіно-[1,3]-діоксалан хлорид (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-ділінолеїл-4,5-біс(диметиламінометил)-[1,3]-діоксалан (DLin-K2-DMA), 2,2-ділінолеїл-4-метилпепіазин-[1,3]-діоксалан (D-Lin-K-N-метилпепіазин) (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-іл 4-(диметиламіно)бутаноат (DLin-M-C3-DMA; "MC3"), ділінолеїлметил-3-диметиламінопропіонат (DLin-M-C2-DMA; також відомі як DLin-M-K-DMA або DLin-M-DMA), 1,2-діоеїлкарбамоїлокси-3-диметиламінопропан (DO-C-DAP), 1,2-димиристолоїл-3-диметиламінопропан (DMDAP), 1,2-діолеїл-3-триметиламінопропан хлорид (DOTAP.Cl), 1,2-ділінолеїлкарбамоїлокси-3-диметиламінопропан (DLin-C-DAP), 1,2-ділінолеїлокси-3-(диметиламіно) ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-ділінолеїлокси-3-морфолінопропан (DLin-MA), 1,2-ділінолеїл-3-диметиламінопропан (DLinDAP), 1,2-ділінолеїлтіо-3-диметиламінопропан (DLin-S-DMA), 1-лінолеїл-2-лінолеїлокси-3-диметиламінопропан (DLin-2-DMAP), 1,2-ділінолеїлокси-3-триметиламінопропан хлоридна сіль (DLin-TMA.Cl), 1,2-ділінолеїл-3-триметиламінопропан хлоридна сіль (DLin-TAP.Cl), 1,2-ділінолеїлокси-3-(N-метилпіперазино)пропан (DLin-MPZ), 3-(N,N-ділінолеїламіно)-1,2-пропандіол (DLinAP), 3-(N,N-діолеїламіно)-1,2-пропандіол (DOAP), 1,2-ділінолеїлокси-3-(2-N,N-диметиламіно)етоксипропан (DLin-EG-DMA), 3-диметиламіно-2-(холест-5-ен-3-бета-оксибутан-4-окси)-1-(цис,цис-9,12-октадієнокси)пропан (CLinDMA), 2-[5'-(холест-5-ен-3-бета-окси)-3'-оксапентокси]-3-димети-1-(цис,цис-9',1-2'-октадекадієнокси)пропан (CpLinDMA), N,N-диметил-3,4-діолеїлоксибензиламін (DMOBA), 1,2-N,N'-діолеїлкарбаміл-3-диметиламінопропан (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-ділінолеїлкарбаміл-3-диметиламінопропан (DLincarbDAP), N,N-діолеїл-N,N-диметиламоній хлорид (DODAC), 1,2-діолеїлокси-N,N-диметиламінопропан (DODMA), 1,2-дистеарилокси-N,N-диметиламінопропан (DSDMA), N-(1-(2,3-діолеїлокси)пропіл)-N,N,N-триметиламоній хлорид (DOTMA), N,N-діастерил-N,N-диметиламоній бромід (DDAB), N-(1-(2,3-діолеїлокси)пропіл)-N,N,N-триметиламоній хлорид (DOTAP), 3-(N-(N',N'-диметиламіноетан)-карбамоїл) холестерол (DC-Хол), N-(1,2-диміристилоксипроп-3-іл)-N,N-диметил-N-гідроксietил амоній бромід (DMRIE), 2,3-діолеїлокси-N-[2(спемін-карбоксамідо)етил]-N,N-диметил-1-пропанамонійтрифлюороацетат (DOSPA), діоктадециламідогліцил спермін (DOGS), їх аналоги, і їх суміші, але не обмежуються ними.

[0262] Додаткові катіонні ліпіди або їх солі, які можуть бути присутніми в ліпідних частках, описаних у цьому документі, містять нові катіонні ліпіди, такі як CP-LenMC3, CP-γ-LenMC3, CP-MC3, CP-DLen-C2K-DMA, CP-γDLen-C2K-DMA, CP-C2K-DMA, CP-DODMA, CP-DPetroDMA, CP-DLinDMA, CP-DLenDMA, CP-γDLenDMA, їх аналоги, а також їх комбінації. Додаткові катіонні ліпіди або їх солі, які можуть бути присутніми в ліпідних частках, описаних у цьому документі, містять MC3 аналоги, такі як LenMC3, γ-LenMC3, MC3MC, MC2C, MC2MC, MC3 тіоефір, MC3 ефір, MC4 ефір, MC3 алкін, MC3 амід, Pan-MC3, Pan-MC4, Pan-MC5, а також їх комбінації.

Додаткові катіонні ліпіди або їх солі, які можуть бути присутніми у ліпідних частках, описаних у цьому документі, містять нові катіонні ліпіди, описані в міжнародній заявці на патент PCT/CA2010/001029, що називається "Покращені катіонні ліпіди і способи доставки нуклеїнових кислот", поданій 30 червня 2010 р. Додаткові катіонні ліпіди або їх солі, які можуть бути присутніми у ліпідних частках, описаних у цьому документі, містять катіонні ліпіди, описані у заявці на патент США № 2009/0023673. Розкриття кожного з цих патентних документів включено у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0263] У деяких варіантах реалізації додатковий катіонний ліпід утворює сіль (бажано кристалічну сіль) з одним або більше аніоном. У одному конкретному варіанті реалізації додатковий катіонний ліпід є оксалатом (наприклад, геміоксалат) сіллю, яка бажано є кристалічною сіллю.

[0264] Синтез катіонних ліпідів, таких як DLinDMA і DLenDMA, а також додаткових катіонних ліпідів описаний у заявці на патент США № 2006/0083780, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0265] Синтез катіонних ліпідів, таких як γ-DLenDMA, C2-dlindma і C2-dlindap, а також додаткових катіонних ліпідів описані у міжнародній заявці на патент PCT/CA2010/001029, що називається "Покращені катіонні ліпіди і способи доставки нуклеїнових кислот", поданій 30 червня 2010 року, опис якої включений у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0266] Синтез катіонних ліпідів, таких як DLin-K-DMA, а також додаткових катіонних ліпідів описаний у PCT публікації WO 09/086558, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0267] Синтез катіонних ліпідів, таких як DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K2-DMA, D-Lin-K-N-метилпіперзин, DLin-M-C2-DMA, DO-C-DAP, DMDAP, і DOTAP.Cl, а також додаткових катіонних ліпідів описаний у публікації PCT WO 2010/042877, що називається "Покращені аміноліпіди і способи доставки нуклеїнових кислот", поданій 9 жовтня 2009 року, розкриття який включено в цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0268] Синтез DLin-M-C3-DMA, а також додаткових катіонних ліпідів, описаний наприклад, у попередній заявці США 61/384050, поданій 17 вересня 2010 року, що називається "Нові катіонні ліпіди і способи їх застосування", розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0269] Синтез катіонних ліпідів, таких як DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMA, DLinTMA.Cl, DLinTAP.Cl, DLinMPZ, DLinAP, DOAP, і DLin-EG-DMA, а також додаткових катіонних ліпідів описані у PCT публікації WO 09/086558, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0270] Синтез катіонних ліпідів, таких як CLinDMA, а також додаткових катіонних ліпідів описані в заявці на патент США № 2006/0240554, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0271] Синтез ряду інших катіонних ліпідів і родинних аналогів були описані в патентах США № 5208036; 5264618; 5279833; 5283185; 5753613 і 5785992; і публікації PCT № WO 96/10390, описи кожного включені в цей документ шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Крім того, ряд комерційних препаратів катіонних ліпідів можуть бути використані, такі як, наприклад LIPOFECTIN® (у тому числі DOTMA і DOPE, доступний від GIBCO/BRL); LIPOFECTAMIN® (у тому числі DOSPA і DOPE, доступний від GIBCO/BRL); і TRANSFECTAM® (у тому числі DOGS, доступний від Promega Corp.).

[0272] У деяких варіантах реалізації цього винаходу катіонний ліпід містить від близько 50 моль % до близько 90 моль %, від близько 50 моль % до близько 85 моль %, від близько 50 моль % до близько 80 моль %, від близько 50 моль %, або близько 75 моль %, від близько 50 моль % до близько 70 моль %, від близько 50 моль % до близько 65 моль %, від близько 50 моль % до близько 60 моль %, від близько 55 моль % до близько 65 моль %, або від близько 55 моль % до близько 70 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. У конкретних варіантах реалізації катіонний ліпід містить близько 50 моль %, 51 моль %, 52 моль %, 53 моль %, 54 моль %, 55 моль %, 56 моль %, 57 моль %, 58 моль %, 59 моль %, 60 моль %, 61 моль %, 62 моль %, 63 моль %, 64 моль % або 65 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0273] В інших варіантах реалізації катіонний ліпід містить від близько 2 моль % до близько 60 моль %, від близько 5 моль % до близько 50 моль %, від близько 10 моль % до близько 50 моль %, від близько 20 моль %, або близько 50 моль %, від близько 20 моль % до близько 40 моль %, від близько 30 моль % до близько 40 моль %, або близько 40 моль % (або будь-якої їх

фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0274] Додаткові відсотки і діапазони катіонних ліпідів, придатних для використання у ліпідних частках за цим винаходом, описані, наприклад, у РСТ публікації WO 09/127060, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0275] Слід розуміти, що відсоток катіонного ліпиду, присутнього у ліпідних частках, за цим винаходом, є кількістю мішеней, і що фактична кількість катіонного ліпиду, присутнього в композиції, може змінюватись, наприклад, у межах ± 5 моль %. Наприклад, в 1:57 препараті ліпідної частки (наприклад, LNP), кількість мішеней катіонного ліпиду складає 57,1 моль %, але фактична кількість катіонного ліпиду може бути ± 5 моль %, ± 4 моль %, ± 3 моль %, ± 2 моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль % або $\pm 0,1$ моль % цієї кількості мішеней, причому залишок препарату складений з інших ліпідних компонентів (доданих до 100 моль % загальних ліпідів, присутніх у частці).

В. Некатіонні ліпіди

[0276] Некатіонні ліпіди, що використовуються у ліпідних частках за цим винаходом (наприклад, LNP), можуть бути будь-якими з множини нейтральних незаряджених, цвіттеріонних або аніонних ліпідів, здатних утворювати стабільний комплекс.

[0277] Необмежуючі приклади некатіонних ліпідів охоплюють фосфоліпіди, такі як лецитин, лізолецитин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, лізофосфатидилетаноламін, фосфатидилінозитол, сфінгомієлін, яєчний сфінгомієлін (ESM), цефалін, кардіоліпін, фосфатидну кислоту, цереброзид, дицетилфосфат, дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC), діолеїлфосфатидилхолін (DOPC), дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC), діолеїлфосфатидилгліцерол (DOPG), дипальмітоїлфосфатидилгліцерол (DPPG), діолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE), пальмітоїлолеїл-фосфатидилхолін (POPC), пальмітоїлолеїл-фосфатидилетаноламін (POPE), пальмітоїлолеїл-фосфатидилгліцерин (POPG), діолеїлфосфатидилетаноламін 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-MAL), дипальмітоїл-фосфатидилетаноламін (DPPE), диміристоїл-фосфатидилетаноламін (DMPE), дистеароїл-фосфатидилетаноламін (DSPE), монометилловий-фосфатидилетаноламін, диметил-фосфатидилетаноламін, дієлаїдоїл-фосфатидилетаноламін (DEPE), стеароїлолеїл-фосфатидилетаноламін (SOPE), лізофосфатидилхолін, ділінолеїлфосфатидилхолін і їх суміші. Інші діацилфосфатидилхолін і діацилфосфатидилетаноламін фосфоліпіди також можуть бути використані. Ацильні групи у цих ліпідах бажано є ацильними групами, одержаними з жирних кислот, що мають C₁₀-C₂₄ вуглецеві ланцюги, наприклад, лаурил, міристоїл, пальмітоїл, стеароїл або олеїл.

[0278] Додаткові приклади некатіонних ліпідів охоплюють стерини, такі як холестерин і його похідні. Необмежуючі приклади похідних холестерину охоплюють полярні аналоги, такі як 5 α -холестанол, 5 β -копростанол, холестерил- (2'-гідрокси)етил ефір, холестерил-(4'-гідрокси)бутил ефір, і 6-кетохолестанол; неполярні аналоги, такі як 5 α -холестан, холестенон, 5 α -холестанон, 5 β -холестанон і холестерил деканоат; і їх суміші. У бажаних варіантах реалізації похідне холестерину є полярним аналогом, таким як холестерил-(4'-гідрокси)бутил ефір. Синтез холестерил-(2'-гідрокси)етил ефіру описаний у РСТ публікації WO 09/127060, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0279] У деяких варіантах реалізації, некатіонний ліпід, присутній у ліпідній частці (наприклад, LNP), містить або складається з суміші одного або більше фосфоліпідів і холестерина або його похідного. В інших варіантах реалізації, некатіонний ліпід, присутній у ліпідній частці (наприклад, LNP), містить або складається з одного або більше фосфоліпідів, наприклад, композиція без холестерину з ліпідною часткою. В інших варіантах реалізації, некатіонний ліпід, присутній у ліпідній частці (наприклад, LNP), містить або складається з холестерину або його похідного, наприклад, препарату без фосфоліпиду з ліпідною часткою.

[0280] Інші приклади некатіонних ліпідів, придатних для використання у цьому винаході, включають безфосфорні ліпіди, такі як, наприклад, стеариламін, додециламін, гексадециламін, ацетил пальмітат, гліцеролрицинолеат, гексадецил стеарат, ізопропілміристат, амфотерні акрилові полімери, триетаноламін лаурил-сульфат, алкіл-арил сульфат, поліетилоксилатний амід жирних кислот, діоктадецилдиметил бромід, кераміди, сфінгомієлін, і тому подібне.

[0281] У деяких варіантах реалізації, некатіонний ліпід містить від близько 10 моль % до близько 60 моль %, від близько 20 моль % до близько 55 моль %, від близько 20 моль % до близько 45 моль %, від близько 20 моль % до близько 40 моль %, від близько 25 моль % до близько 50 моль %, від близько 25 моль % до близько 45 моль %, від близько 30 моль % до близько 50 моль %, від близько 30 моль % до близько 45 моль %, від близько 30 моль % до близько 40 моль %, від близько 35 моль % до близько 45 моль %, від близько 37 моль % до близько 42 моль %, або близько 35 моль %, 36 моль %, 37 моль %, 38 моль %, 39 моль %, 40

моль %, 41 моль %, 42 моль %, 43 моль %, 44 моль % або 45 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0282] У варіантах реалізації, де ліпідні частки містять суміш фосфоліпідів і холестерину або похідні холестерину, суміш може містити аж до близько 40 моль %, 45 моль %, 50 моль %, 55 моль % або 60 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0283] У деяких варіантах реалізації, фосфоліпідний компонент у суміші може складати від близько 2 моль % до близько 20 моль %, від близько 2 моль % до близько 15 моль %, від близько 2 моль % до близько 12 моль %, від близько 4 моль % до близько 15 моль %, або від близько 4 моль % до близько 10 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. У деяких бажаних варіантах реалізації компонент фосфоліпідів у суміші складає від близько 5 моль % до близько 10 моль %, від близько 5 моль % до близько 9 моль %, від близько 5 моль % до близько 8 моль %, від близько 6 моль % до близько 9 моль %, від близько 6 моль % до близько 8 моль % або від близько 5 моль %, 6 моль %, 7 моль %, 8 моль %, 9 моль %, або 10 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Як необмежувачий приклад, 1:57 ліпідна композиція часток, що містить суміш фосфоліпідів і холестерину, може містити фосфоліпід, такий як DPPC або DSPC, близько 7 моль % (або будь-якої їх фракції), наприклад, у суміші з холестерином або похідним холестерину при близько 34 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. В іншому необмежувачому прикладі, 7:54 ліпідна композиція часток, що містить суміш фосфоліпідів і холестерину, може містити фосфоліпід, такий як DPPC або DSPC, близько 7 моль % (або будь-якої їх фракції), наприклад, у суміші з холестерином або похідним холестерину при близько 32 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0284] У інших варіантах реалізації компонент холестерину в суміші може складати від близько 25 моль % до близько 45 моль %, від близько 25 моль % до близько 40 моль %, від близько 30 моль % до близько 45 моль %, від близько 30 моль % до близько 40 моль %, від близько 27 моль % до близько 37 моль %, від близько 25 моль % до близько 30 моль %, або від близько 35 моль % до близько 40 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. У деяких бажаних варіантах реалізації компонент холестерину в суміші складає від близько 25 моль % до близько 35 моль %, від близько 27 моль % до близько 35 моль %, від близько 29 моль % до близько 35 моль %, від близько 30 моль % до близько 35 моль %, від близько 30 моль % до близько 34 моль %, від близько 31 моль % до близько 33 моль %, або близько 30 моль %, 31 моль %, 32 моль %, 33 моль %, 34 моль %, або 35 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Як правило, 1:57 ліпідна композиція часток, що містить суміш фосфоліпідів і холестерину, може містити холестерин або похідне холестерину близько 34 моль % (або будь-якої їх фракції), наприклад, у суміші з фосфоліпідом, таким як DPPC або DSPC, при близько 7 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Як правило, 7:54 ліпідна композиція часток, що містить суміш фосфоліпідів і холестерину, може містити холестерин або похідне холестерину близько 32 моль % (або будь-якої їх фракції), наприклад, у суміші з фосфоліпідом, таким як DPPC або DSPC, при близько 7 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0285] У варіантах реалізації, де ліпідні частки є безфосфоліпідними, холестерин або його похідне можуть містити до близько 25 моль %, 30 моль %, 35 моль %, 40 моль %, 45 моль %, 50 моль %, 55 моль %, або 60 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0286] У деяких варіантах реалізації, холестерин або його похідне фосфоліпідів у безліпідній частці може складати від близько 25 моль % до близько 45 моль %, від близько 25 моль % до близько 40 моль %, від близько 30 моль %, або близько 45 моль %, від близько 30 моль % до близько 40 моль %, від близько 31 моль % до близько 39 моль %, від близько 32 моль % до близько 38 моль %, від близько 33 моль % до близько 37 моль %, від близько 35 моль % до близько 45 моль %, від близько 30 моль % до близько 35 моль %, від близько 35 моль % до близько 40 моль %, або близько 30 моль %, 31 моль %, 32 моль %, 33 моль %, 34 моль %, 35 моль %, 36 моль %, 37 моль %, 38 моль %, 39 моль % або 40 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. Як не обмежувачий приклад, композиція часток ліпідів 1:62 може містити холестерин при близько 37 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці. В іншому необмежувачому прикладі, композиція часток ліпідів 7:58 може містити холестерин при близько 35 моль % (або будь-якої їх фракції) від загальної кількості ліпідів, що знаходяться в частці.

[0287] У інших варіантах реалізації, не-катіонний ліпід містить від близько 5 моль % до близько 90 моль %, від близько 10 моль % до близько 85 моль %, від близько 20 моль % до

близько 80 моль %, близько 10 моль % (наприклад, лише фосфоліпід), або близько 60 моль % (наприклад, фосфоліпід і холестерин або його похідне) (або будь-яку їх фракцію або їх діапазон) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0288] Додаткові відсотки і діапазони некатіонних ліпідів, придатні для використання в ліпідних частках за цим винаходом, описані, наприклад, у РСТ публікації WO 09/127060, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання для всіх цілей.

[0289] Слід розуміти, що відсоток некатіонних ліпідів, присутніх у ліпідних частках за цим винаходом, є кількістю мішеней, і що фактична кількість присутніх некатіонних ліпідів у композиції може змінюватись, наприклад, на ± 5 моль %. Наприклад, у 1:57 препараті ліпідної частки (наприклад, LNP), кількість мішеней фосфоліпиду складає 7,1 моль % і кількість мішеней холестерину складає 34,3 моль %, але фактична кількість фосфоліпідів може бути ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль %, або $\pm 0,1$ моль % цієї суми мішеней, а фактична кількість холестерину може бути ± 3 моль %, ± 2 моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль %, або $\pm 0,1$ моль % цієї суми мішеней, причому залишок препарату складений з інших ліпідних компонентів (до додавання 100 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці). Аналогічним чином, у 7:54 препараті ліпідних часток (наприклад, LNP), кількість мішеней фосфоліпиду складає 6.75 моль % і кількість мішеней холестерину складає 32.43 моль %, але фактична кількість фосфоліпиду може бути ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль % $\pm 0,25$ моль % або $\pm 0,1$ моль % цієї кількості мішеней, і фактична кількість холестерину може бути ± 3 моль %, ± 2 моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль %, або $\pm 0,1$ моль % цієї кількості мішеней, причому залишок препарату складений з інших ліпідних компонентів (додавання до 100 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці).

С. Ліпідні кон'югати

[0290] На додаток до катіонних і некатіонних ліпідів, ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть додатково містити ліпідний кон'югат. Кон'югований ліпід є корисним у тому, що він запобігає агрегації часток. Прийнятні ліпідні кон'югати охоплюють PEG-кон'югати ліпідів, POZ-ліпідні кон'югати, АТТА-ліпідні кон'югати, катіонно-полімерно-ліпідні кон'югати (CPL), а також їх суміші, але не обмежуються ними. У деяких варіантах реалізації частки містять або PEG-кон'югати ліпідів, або АТТА-ліпідні кон'югати разом із CPL.

[0291] У бажаному варіанті реалізації ліпідний кон'югат є PEG-ліпідом. Приклади PEG-ліпідів охоплюють PEG, поєднаний із діалкілоксипропілами (PEG-DAA), як описано, наприклад, у РСТ публікації WO 05/026372, PEG, поєднаний з діацилгліцеридами (PEG-DAG), як описано у, наприклад, публікаціях заявок на патент США №№ 2003/0077829 і 2005/008689, PEG, поєднаний з фосфоліпідами, такими як фосфатидилетаноламін (PEG-PE), кон'югований з PEG керамід, як описано, наприклад, у патенті США № 5885613, кон'югований з PEG холестерин або його похідні, а також їх суміші, але не обмежуються ними. Розкриття цих патентних документів включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

Додаткові PEG-ліпіди, придатні для використання у цьому винаході, охоплюють, без обмеження, mPEG2000-1,2-ді-О-алкіл-sn3-карбомоїлгліцерид (PEG-C-DOMG). Синтез PEG-C-DOMG описаний у РСТ публікації WO 09/086558, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Проте, додаткові прийнятні PEG-кон'югати ліпідів містять, без обмеження, 1-[8'-(1,2-диміристоїл-3-пропанокси)-карбоксамідо-3',6'-діоксаоктаніл]карбомоїл- ω -метил-полі(етилгліколь) (2KPEG-DMG). Синтез 2KPEG-DMG описаний у патенті США № 7404969, опис якого включений у цьому документі шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0292] PEG є лінійним, водорозчинним полімером етилену PEG ланок, що повторюються, з двома кінцевими гідроксильними групами. PEG класифікують по їх молекулярній масі; наприклад, PEG 2000 має середню молекулярну масу близько 2000 дальтон, і PEG 5000 має середню молекулярну масу близько 5000 дальтон. PEG є комерційно доступними від Sigma Chemical Co. і інших компаній, і охоплюють наступні: монометоксиполіетиленгліколь (MePEG-OH), монометоксиполіетиленгліколя-сукцинат (MePEG-S), монометоксиполіетиленгліколя-сукцинімідил сукцинат (MePEG-S-NHS), монометоксиполіетиленгліколя-амін (MePEG-NH₂), монометоксиполіетиленгліколя-трезилат (MePEG-TRES), монометоксиполіетиленгліколя-імідазоліл-карбоніл (MePEG-IM), але не обмежуються ними, а також такі сполуки, що містять кінцеву гідроксильну групу замість термінальної метокси групи (наприклад, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH₂, і так далі). Інші PEG, такі як описані у патентах США №№ 6774180 і 7053150 (наприклад, MPEG(20 кДа)амін) також можуть бути використані для одержання PEG-кон'югатів ліпідів для реалізації цього винаходу. Опис цих патентів включені в даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Крім того, монометоксиполіетиленгліколь

оцтової кислоти (MePEG-CH₂COOH) особливо корисний для одержання PEG-кон'югатів ліпідів, у тому числі, наприклад, PEG-кон'югатів DAA.

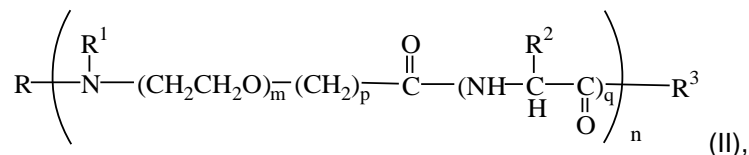
[0293] PEG фрагмент з PEG-ліпідних кон'югатів, описаних у цьому документі, може містити середню молекулярну масу в діапазоні від близько 550 дальтон до близько 10000 дальтон. У деяких випадках, фрагмент PEG має середню молекулярну масу від близько 750 дальтон до близько 5000 дальтон (наприклад, від близько 1000 дальтон до близько 5000 дальтон, близько від 1500 дальтон до близько 3000 дальтон, близько від 750 дальтон до близько 3000 дальтон, від близько 750 дальтон до близько 2000 дальтон, і так далі). У бажаних варіантах реалізації винаходу фрагмент PEG має середню молекулярну масу близько 2000 дальтон або близько 750 дальтон.

[0294] В деяких випадках, PEG може бути необов'язково заміщений алкільною, алкокси, ацильною, або арильною групою. PEG може бути кон'югований безпосередньо з ліпідом або може бути зв'язаний з ліпідами за допомогою лінкерної частини молекули. Будь-який зв'язуючий фрагмент, призначений для сполуки PEG до ліпиду, може бути використаний, у тому числі, наприклад, не-ефір, що містить лінкерні фрагменти і складні ефіри, що містять лінкерні фрагменти. У бажаному варіанті реалізації зв'язуючий фрагмент є не-ефіром, що містить лінкерну групу. Як використано в цьому описі, термін "не-ефір, що містить зв'язуючий фрагмент" відноситься до лінкера, який не містить карбоксильний ефірний зв'язок (OC(O)-). Прийнятні не-ефіри, що містять лінкерні фрагменти, охоплюють амідо (C(O)NH-), аміно (-NR-), карбоніл (C(O)-), карбамат (-NHC(O)O-), сечовини (-NHC(O)NH-), дисульфід (-SS-), ефір (-O-), сукциніл (-O)CCH₂CH₂C(O)-, сукцинамідил (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), ефір, дисульфід, а також їх комбінації (наприклад, лінкери, що містять як карбамат лінкерний фрагмент, так і амідо лінкер). У бажаному варіанті реалізації, карбаматний лінкер використовується для сполуки PEG з ліпідом.

[0295] У інших варіантах реалізації, складний ефір, що містить зв'язуючий фрагмент використовується для приєднання PEG до ліпиду. Прийнятні складні ефіри, що містять лінкерні групи, охоплюють, наприклад, карбонат (OC(O)O-), сукциноіл, фосфатні ефіри (-O-(O)-O-POH), сульфонатні складні ефіри і їх комбінації.

[0296] Фосфатидилетаноламіни, що мають різні групи ацилових ланцюгів різної довжини ланцюга і міри насичення, можуть бути кон'юговані з PEG із одержанням ліпідного кон'югата. Такі фосфатидилетаноламіни є комерційно доступними, або можуть бути ізольовані або синтезовані з використанням звичайних способів, відомих фахівцям у даній області. Бажані фосфатидилетаноламіни містять насичені або ненасичені жирні кислоти з довжиною вуглецевого ланцюга в інтервалі від C₁₀ до C₂₀. Фосфатидилетаноламіни з одноатомними або диненасиченими жирними кислотами і суміші насичених і ненасичених жирних кислот також можуть бути використані. Прийнятні фосфатидилетаноламіни охоплюють диміристоїлфосфатидилетаноламін (DMPE), дипальмітоїл-фосфатидилетаноламін (DPPE), діолеїлфосфатидилетаноламін (DOPE) і дистеароїлфосфатидилетаноламін (DSPE), але не обмежуються ними.

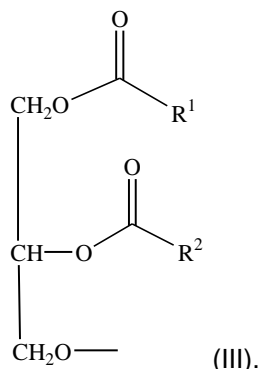
[0297] Термін «АТТА» або «поліамід» охоплює, без обмеження, сполуки, описані в патентах США №№ 6320017 і 6586559, описи яких включені у цьому документі шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Ці сполуки охоплюють сполуки, що мають формулу:



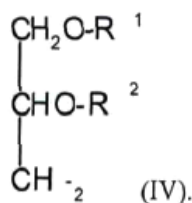
де R є членом, вибраним з групи, що складається з водню, алкілу і ацила; R¹ є членом, вибраним з групи, що складається з водню і алкілу; або необов'язково, R і R¹ і атом азоту, до якого вони приєднані, утворюють азидо фрагмент; R² є членом групи, вибраним з водню, необов'язково заміщеного алкілу, необов'язково заміщеного арила і бічного ланцюга амінокислоти; R³ є членом, вибраним з групи, що складається з водню, галогену, гідроксі, алкокси, меркапто, гідразино, аміно і NR⁴R⁵, де R⁴ і R⁵ незалежно є воднем або алкілом; n приймає значення від 4 до 80; m приймає значення від 2 до 6; p приймає значення від 1 до 4; і q приймає значення 0 або 1. Фахівцям у даній області вочевидь, що і інші поліаміди можуть бути використані у сполуках для реалізації цього винаходу.

[0298] Термін "діацилгліцерин" або "DAG" охоплює сполуку, що має 2 жирні ацильні

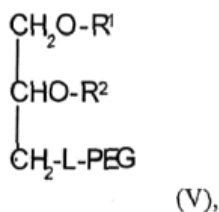
ланцюги, R^1 і R^2 , обидва з яких незалежно один від одного мають від 2 до 30 атомів вуглецю, сполучених з гліцерином в 1 і 2-положенні за допомогою ефірного зв'язку. Ацильні групи можуть бути насиченими або мати різну міру ненасиченості. Прийнятні ацильні групи охоплюють лауроїл (C_{12}), міристоїл (C_{14}), пальмітоїл (C_{16}), стеароїл (C_{18}) і ікозоїл (C_{20}), але не обмежуються ними. У бажаних варіантах реалізації, R^1 і R^2 є однаковими, тобто R^1 і R^2 обидва є міристоїлом (тобто, диміристоїлом), R^1 і R^2 обидва є стеароїлом (тобто, дистеароїлом) і так далі. Діацилгліцеріни мають наступну загальну формулу:



[0299] Термін "діалкілоксипропіл" або "DAA" охоплює сполуки, що мають 2 алкільні ланцюги, R^1 і R^2 , обидві з яких незалежно один від одного мають від 2 до 30 атомів вуглецю. Алкільні групи можуть бути насиченими або мати різну міру ненасиченості. Діалкілоксипропіли мають наступну загальну формулу:



[0300] У бажаному варіанті реалізації винаходу PEG-ліпід є кон'югатом PEG-DAA, що має наступну формулу:



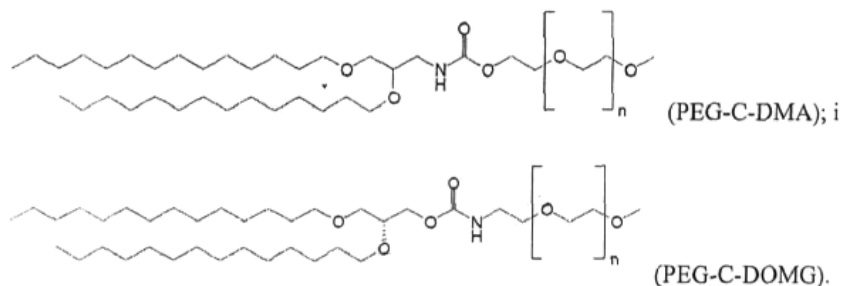
де R^1 і R^2 незалежно вибрані і представлені довголанцюжковими алкільними групами, що мають від близько 10 до близько 22 атомів вуглецю; PEG є поліетиленгліколем; і L є не-ефіром, що містить лінкерну частину, або складним ефіром, що містить лінкер, як описано вище. Алкільні групи з довгим ланцюгом можуть бути насиченими або ненасиченими. Прийнятні алкільні групи охоплюють децил (C_{10}), лаурил (C_{12}), міристил (C_{14}), пальмітил (C_{16}), стеарил (C_{18}), і ікозил (C_{20}), але не обмежуються ними. У бажаних варіантах реалізації, R^1 і R^2 є однаковими, тобто, R^1 і R^2 обидва є міристилом (тобто, диміристилом), R^1 і R^2 обидва є стеарилом (тобто, дистеарилом), і так далі.

[0301] У формулі V вище, PEG має середню молекулярну масу в діапазоні від близько 550 дальтон до близько 10000 дальтон. У деяких випадках, PEG має середню молекулярну масу від близько 750 дальтон до близько 5000 дальтон (наприклад, від близько 1000 дальтон до близько 5000 дальтон, близько від 1500 дальтон до близько 3000 дальтон, близько від 750 дальтон до близько 3000 дальтон, близько від 750 дальтон до близько 2000 дальтон, і так далі). У бажаних варіантах реалізації винаходу PEG має середню молекулярну масу близько 2000 дальтон або близько 750 дальтон. PEG може бути необов'язково заміщеним алкільною, алкокси, ацильною,

або арильною групами. У деяких варіантах реалізації, термінальна гідроксильна група заміщена метокси або метильною групою.

[0302] У бажаному варіанті реалізації, "L" не є складним ефіром, що містить лінкерну групу. Прийнятні нескладні ефіри, що містять лінкери, охоплюють амідно лінкерний фрагмент, аміно лінкерний фрагмент, карбонільний лінкерний фрагмент, карбаматний лінкерний фрагмент, сечовинний лінкерний фрагмент, простий ефірний лінкерний фрагмент, дисульфідний лінкерний фрагмент, сукцинамідил лінкерний фрагмент, а також їх комбінації, але не обмежуються ними. У бажаному варіанті реалізації не-ефір, що містить зв'язуючий фрагмент, є зв'язуючим фрагментом карбамінової кислоти (тобто, кон'югат PEG-C-DAA). У іншому бажаному варіанті реалізації не-ефір, що містить зв'язуючий фрагмент, є амідно лінкерним фрагментом (тобто, кон'югатом PEG-A-DAA). У ще одному бажаному варіанті реалізації не-ефір, що містить зв'язуючий фрагмент, є сукцинамідил лінкерним фрагментом (тобто, кон'югатом PEG-S-DAA).

[0303] У деяких варіантах реалізації, PEG-ліпідні кон'югати вибрані з:



[0304] Кон'югати PEG-DAA синтезовані з використанням стандартних методик і реагентів, відомих фахівцям у даній області. Слід мати на увазі, що кон'югати PEG-DAA міститимуть різні аміди, аміни, ефірні, тіо, карбамати, і уретанові лінкери. Фахівцям у даній області техніки буде зрозуміло, що способи і реагенти для утворення цих зв'язків добре відомі і легко доступні. Див., наприклад, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); і Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5th ed. (Longman 1989). Крім того, слід розуміти, що присутність будь-яких функціональних груп може зажадати захисту і зняття захисту в різних точках при синтезі кон'югатів PEG-DAA. Фахівцям у даній області техніки буде зрозуміло, що такі способи добре відомі. Див., наприклад, Green and Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

[0305] Бажано, PEG-DAA кон'югат є PEG-дидецилоксипропіл (C_{10}) кон'югатом, PEG-дилаурилоксипропіл (C_{12}) кон'югатом, PEG-диміристилоксипропіл (C_{14}) кон'югатом, PEG-дипальмітолоксипропіл (C_{16}) кон'югатом, або PEG-дистеарилоксипропіл (C_{18}) кон'югатом. У цих варіантах реалізації, PEG бажано має середню молекулярну масу від близько 750 або близько 2000 дальтон. У одному особливо бажаному варіанті реалізації винаходу PEG-ліпідний кон'югат містить PEG2000-C-DMA, який відрізняється тим, що "2000" позначає середню молекулярну масу PEG, "C" позначає карбаматний лінкерний фрагмент, і "DMA" позначає диміристилоксипропіл. У іншому особливо бажаному варіанті реалізації винаходу PEG-ліпідний кон'югат містить PEG750-C-DMA, який відрізняється тим, що "750" позначає середню молекулярну масу PEG, "C" позначає карбаматний лінкерний фрагмент, і "DMA" позначає диміристилоксипропіл. У конкретних варіантах реалізації, термінальна гідроксильна група PEG заміщена метильною групою. Фахівцям у даній області техніки повинно бути зрозуміло, що інші діалкілоксипропіли можуть бути використані в PEG-DAA кон'югатах за цим винаходом.

[0306] На додаток до вищевикладеного, фахівцям у даній області техніки вочевидь, що інші гідрофільні полімери можуть бути використані замість PEG. Приклади прийнятних полімерів, які можуть бути використані замість PEG, охоплюють полівінілпіролідон, поліметилоксазолін, поліетилоксазолін, полігідроксипропіл, метакриламід, поліметакриламід і полідиметилакриламід, полімолочна кислота, полігліколева кислота, і похідні целюлоза, такі як гідроксietилцелюлоза або гідроксиметилцелюлоза.

[0307] На додаток до вказаних вище компонентів, ліпідні частки (наприклад, LNP) за цим винаходом можуть додатково містити катіонний полі(етилгліколь) (PEG) ліпіди або CPL (див., наприклад, Chen et al., Biosonj. Chem., 11:433-437 (2000); патент США № 6852334; PCT публікація WO 00/62813, описи яких включені у даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей).

[0308] Прийнятні CPL містять сполуки за формулою VI:

A-W-Y (VI)

де A, W, і Y описані нижче.

[0309] Із посиланням на Формулу VI, "A" є фрагментом ліпиду, таким, як амфіфатичний ліпід, нейтральний ліпід, або гідрофобний ліпід, який діє як ліпід-фіксатор. Прийнятні приклади ліпідів охоплюють діацилгліцероли, діалкілгліцероли, N-N-діалкіламіни, 1,2-діацилокси-3-амінопропани, і 1,2-діалкіл-3-амінопропани, але не обмежуючись ними.

[0310] "W" є полімером або олігомером, таким як гідрофільний полімер або олігомер. Бажано, гідрофільний полімер є біосумісним полімером, який є неімуногенним або має низьку імуногенність. Альтернативно, гідрофільний полімер може бути слабоантигенним при використанні з відповідними ад'ювантами. Прийнятні полімери охоплюють неімуногенні PEG, поліаміди, полімолочну кислоту, полігліколеву кислоту, співполімери полімолочної кислоти/полігліколевої кислоти і їх комбінації, але не обмежуються ними. У бажаному варіанті реалізації полімер має молекулярну масу від близько 250 до близько 7000 дальтон.

[0311] "Y" є полікатіонним фрагментом. Термін «полікатіонний фрагмент» відноситься до сполуки, похідного або функціональної групи, що має позитивний заряд, бажано щонайменше 2 позитивних заряди у вибраному рН, бажано фізіологічному рН. Прийнятні полікатіонні фрагменти охоплюють основні амінокислоти і їх похідні, такі як аргінін, аспарагін, глутамін, лізин, гістидин і спермін; спермідин; катіонні дендримери; поліаміни; поліамінові цукри і полісахариди амінокислоти. Полікатіонні фрагменти можуть бути лінійними, такими як лінійний тетралізін, розгалуженими або дендритними по структурі. Полікатіонні фрагменти мають від близько 2 до близько 15 позитивних зарядів, бажано від близько 2 до близько 12 позитивних зарядів, а бажаніше від близько 2 до близько 8 позитивних зарядів у вибраних значеннях рН. Вибір полікатіонних фрагментів може бути визначений за допомогою типа додатка часток, які потрібні.

[0312] Зв'язки полікатіонних фрагментів можуть бути або розподілені по всьому фрагменту частки, або як альтернатива, вони можуть бути дискретно концентровані по щільності заряду в одному конкретному районі фрагмента частки, наприклад, заряду спайка. Якщо щільність заряду поширюється по частці, щільність заряду може бути рівномірно розподілена або нерівномірно розподілена. Усі варіації розподілу заряду полікатіонного фрагмента входять в обсяг цього винаходу.

[0313] Ліпід "A" і неімуногенний полімер "W" можуть бути приєднані різними способами і бажано за рахунок ковалентного приєднання. Способи, відомі фахівцям у даній області, можуть бути використані для ковалентного приєднання "A" і "W". Прийнятні зв'язки включають амідні, амінні, карбоксильні, карбонатні, карбаматні, складноефірні, і гідразонові зв'язки, але не обмежуються ними. Фахівцям у даній області техніки вочевидь, що "A" і "W" повинні мати додаткові функціональні групи для здійснення зв'язку. Реакція цих двох груп, однієї на ліпіді, а іншої на полімері, забезпечуватимуть бажаний зв'язок. Наприклад, коли ліпід є діацилгліцериним і кінцеві гідроксильні групи активуються, наприклад, за допомогою NHS і DCC, з утворенням активного складного ефіру, і потім піддаються взаємодії з полімером, який містить аміногрупу, наприклад, за допомогою поліаміду (див., наприклад, патенти США №№ 6320017 і 6586559, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей), між двома групами утворюється амідний зв'язок.

[0314] В деяких випадках, полікатіонний фрагмент може бути приєднаний до ліганду, такому як ліганд-мішень або хелатуючий фрагмент для утворення комплексу з кальцієм. Бажано, після того, як ліганд приєднаний, катіонний фрагмент зберігає позитивний заряд. У деяких випадках, ліганд, який приєднаний, має позитивний заряд. Прийнятні ліганди охоплюють сполуки або пристрої з реакційноспроможною функціональною групою, але не обмежуються ними, і охоплюють ліпіди, амфіпатичні ліпіди, сполуки-носії, біоафінні сполуки, біоматеріали, біополімери, біомедичні пристрої, сполуки, що аналітично виявляються, терапевтично активні сполуки, ферменти, пептиди, білки, антитіла, імунні стимулятори, радіоактивні мітки, флюорогени, біотин, лікарські засоби, гаптени, ДНК, РНК, полісахариди, ліпосоми, міцелли, віросоми, імуноглобуліни, функціональні групи, інші фрагменти-мішені або токсини.

[0315] У деяких варіантах реалізації ліпідний кон'югат (наприклад, PEG-ліпід) містить від близько 0,1 моль % до близько 2 моль %, від близько 0,5 моль % до близько 2 моль %, від близько 1 моль % до близько 2 моль %, від близько 0,6 моль % до близько 1,9 моль %, від близько 0,7 моль % до близько 1,8 моль %, від близько 0,8 моль % до близько 1,7 моль %, від близько 0,9 моль % до близько 1,6 моль %, від близько 0,9 моль % до близько 1,8 моль %, від близько 1 моль % до близько 1,8 моль %, від близько 1 моль % до близько 1,7 моль %, від близько 1,2 моль % до близько 1,8 моль %, від близько 1,2 моль % до близько 1,7 моль %, від близько 1,3 моль % до близько 1,6 моль %, або від близько 1,4 моль % до близько 1,5 моль %

(або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0316] У інших варіантах реалізації ліпідний кон'югат (наприклад, PEG-ліпід) містить від близько 0 моль % до близько 20 моль %, від близько 0,5 моль % до близько 20 моль %, від близько 2 моль % до близько 20 моль %, від близько 1,5 моль % до близько 18 моль %, від близько 2 моль % до близько 15 моль %, від близько 4 моль % до близько 15 моль %, від близько 2 моль % до близько 12 моль %, від близько 5 моль % до близько 12 моль %, або близько 2 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0317] У інших варіантах реалізації ліпідний кон'югат (наприклад, PEG-ліпід) містить від близько 4 моль % до близько 10 моль %, від близько 5 моль % до близько 10 моль %, від близько 5 моль % до близько 9 моль %, від близько 5 моль % до близько 8 моль %, від близько 6 моль % до близько 9 моль %, від близько 6 моль % до близько 8 моль % або від близько 5 моль %, 6 моль %, 7 моль %, 8 моль %, 9 моль % або 10 моль % (або будь-якої їх фракції або їх діапазону) від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці.

[0318] Додаткові приклади, відсотки та/або діапазони ліпідних кон'югатів, придатних для використання в ліпідних частках за цим винаходом, описані, наприклад, у публікації PCT № WO 09/127060 і публікації PCT № WO 2010/006282, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0319] Слід розуміти, що відсоток ліпідних кон'югатів (наприклад, PEG-ліпідів), присутніх у ліпідних частках за цим винаходом, є кількістю мішеней, і ця фактична кількість ліпідних кон'югатів, присутніх у композиції, може варіювати, наприклад, у межах ± 2 моль %. Наприклад, у 1:57 препараті ліпідної частки (наприклад, LNP), цільова кількість ліпідних кон'югатів складає 1,4 моль %, але фактична кількість ліпідних кон'югатів може бути $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,4$ моль %, $\pm 0,3$ моль %, $\pm 0,2$ моль %, $\pm 0,1$ моль %, або $\pm 0,05$ моль % від цієї кількості мішеней, причому останній препарат може бути складений з інших ліпідних компонентів (додавання до 100 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці). Аналогічним чином, у 7:54 препараті ліпідної частки (наприклад, LNP), кількість мішеней ліпідних кон'югатів складає 6,76 моль %, але фактична кількість ліпідних кон'югатів може бути ± 2 моль %, $\pm 1,5$ моль %, ± 1 моль %, $\pm 0,75$ моль %, $\pm 0,5$ моль %, $\pm 0,25$ моль % або $\pm 0,1$ моль % від цієї кількості мішеней, причому останній препарат може бути складений з інших ліпідних компонентів (додавання до 100 моль % від загальної кількості ліпідів, присутніх у частці).

[0320] Фахівцеві у даній області техніки буде зрозуміло, що концентрація ліпідних кон'югатів може змінюватися залежно від ліпідного кон'югата, що застосовується, і швидкості, з якою ліпідна частка повинна зливатися.

[0321] Контролюючи склад і концентрацію ліпідного кон'югата, можна контролювати швидкість, з якою ліпідні кон'югати утворюються з ліпідних часток і, у свою чергу, швидкість, з якою ліпідна частка зливається. Наприклад, коли кон'югат PEG-DAA використовується як ліпідний кон'югат, швидкість, з якою ліпідна частка зливається, можна варіювати, наприклад, шляхом зміни концентрації ліпідного кон'югата, шляхом зміни молекулярної маси PEG, або шляхом зміни довжини ланцюгу і мірі насичення алкільних груп кон'югата PEG-DAA. Крім того, інші змінні, у тому числі, наприклад, pH, температура, іонна сила і так далі, можуть бути використані для зміни та/або контролювання швидкості, з якою ліпідна частка зливається. Інші способи, які можуть бути використані для того, щоб контролювати швидкість, з якою ліпідна частка зливається, стануть очевидними фахівцям у даній області техніки після прочитання цього розкриття. Крім того, шляхом регулювання складу і концентрації ліпідного кон'югата можна контролювати розмір ліпідної частки (наприклад, LNP).

VI. Підготовка ліпідних часток

[0322] Ліпідні частки за цим винаходом, наприклад, LNP, в яких активний агент або терапевтичний засіб, такий як інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК) є поміщеними в ліпідну частину частки і захищеними від розкладання, можуть бути утворені будь-яким способом, відомим у даній області, у тому числі способом безперервного змішування, способом прямого розбавлення, і способом розбавлення в режимі реального часу, але не обмежуючись ними.

[0323] У конкретних варіантах реалізації катіонні ліпіди можуть містити ліпіди за формулою I або їх солі, окремо або в комбінації з іншими катіонними ліпідами. В інших варіантах реалізації некатіонні ліпіди є яєчним сфінгомієліном (ESM), дистеароїлфосфатидилхоліном (DSPC), діолеїлфосфатидилхоліном (DOPC), 1-пальмітоїл-2-олеїл-фосфатидилхоліном (POPC), дипальмітоїл-фосфатидилхоліном (DPPC), монометил-фосфатидилетаноламіном, диметил-фосфатидилетаноламіном, 14:0 PE (1,2-диміристоїл-фосфатидилетаноламіном (DMPE)), 16:0 PE (1,2-дипальмітоїл-фосфатидилетаноламіном (DPPE)), 18:0 PE (1,2-дистеароїл-фосфатидилетаноламіном (DSPE)), 18:1 PE (1,2-діолеїл-фосфатидилетаноламіном (DOPE)),

18:1 транс-PE (1,2-діелаїдоїл-фосфатидилетаноламіном (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-стеароїл-2-олеоїл-фосфатидилетаноламіна (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-пальмітоїл-2-олеоїл-фосфатидилетаноламін (POPE)), полімерами на основі поліетиленгліколя (наприклад, PEG 2000, PEG 5000, PEG-модифіковані діацилгліцерини, або PEG-модифіковані діалкілоксипропіли), холестерини, їх похідними або їх комбінаціями.

[0324] У деяких варіантах реалізації цей винахід відноситься до нуклеїнових кислотно-ліпідних часток (наприклад, LNP), отриманих за допомогою способу безперервного змішування, наприклад, способу, який включає одержання водного розчину, що містить нуклеїнову кислоту (наприклад, інтерферуючу РНК) у першому резервуарі, одержання органічного розчину ліпідів у другому резервуарі (де ліпіди присутні в органічному ліпідному розчині, розчиненому в органічному розчиннику, наприклад, нижчому алканолі, такому як етанол), і змішування водного розчину з органічним розчином таким чином, що органічний ліпідний розчин змішується з водним розчином так, щоб по суті миттєво виробляти ліпідні бульбашки (наприклад, ліпосоми), що інкапсулюють нуклеїнову кислоту в ліпідних бульбашках. Цей спосіб і пристрій для реалізації цього способу детально описані в заявці на патент США № 2004/0142025, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0325] Дія безперервного введення ліпідів і буферних розчинів у середовище змішування, наприклад, у камеру змішувача, викликає безперервне розбавлення ліпідного розчину з буферним розчином, внаслідок чого одержують ліпідні бульбашки по суті миттєво при змішуванні. Як використано в цьому описі, фраза "безперервне розбавлення розчину ліпідів із буферним розчином" (і варіації) у загальному випадку позначає, що ліпідний розчин розбавляли досить швидко в процесі гідратації з достатньою силою для реалізації генерування бульбашок. При змішуванні водного розчину, що містить нуклеїнову кислоту, з органічним розчином ліпідів, органічний розчин ліпідів зазнає ступінчастого безперервного розбавлення у присутності буферного розчину (тобто, водного розчину) з одержанням нуклеїнових кислотно-ліпідних часток.

[0326] Нуклеїнові кислотно-ліпідні частки, сформовані за способом безперервного змішування, як правило, мають розмір від близько 30 нм до близько 150 нм, від близько 40 нм до близько 150 нм, від близько 50 нм до близько 150 нм, від близько 60 нм до близько 130 нм, від близько 70 нм до близько 110 нм, від близько 70 нм до близько 100 нм, від близько 80 нм до близько 100 нм, від близько 90 нм до близько 100 нм, від близько 70 до близько 90 нм, від близько 80 нм до близько 90 нм, від близько 70 нм до близько 80 нм, менше ніж близько 120 нм, 110 нм, 100 нм, 90 нм або 80 нм або близько 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм, або 150 нм (будь-якої їх фракції або діапазону в ній). Частки, таким чином, не агрегують і, необов'язково, такий розмір дозволяє досягти однорідного розміру часток.

[0327] У іншому варіанті реалізації цей винахід відноситься до нуклеїнової кислотно-ліпідної частки (наприклад, LNP), отриманої шляхом способу прямого розбавлення, що включає формування розчину ліпідних бульбашок (наприклад, ліпосом) і негайного і безпосереднього введення розчину ліпідних бульбашок у збірний резервуар, що містить регульовану кількість буфера для розведення. У бажаних аспектах, збірний резервуар включає один або більше елементів, сконфігурованих з можливістю перемішування вмісту цього резервуару, щоб полегшити розчинення. В одному аспекті, кількість буфера для розведення, присутнього в збірному резервуарі, по суті дорівнює об'єму ліпідних бульбашок розчину, введенного в нього. Як необмежувачий приклад, ліпідні бульбашки розчину у 45% етанолі при введенні в накопичувальний резервуар, що містить рівний об'єм буфера для розведення, будуть переважно отримані у вигляді дрібних часток.

[0328] У ще одному варіанті реалізації цей винахід відноситься до нуклеїнових кислотно-ліпідних часток (наприклад, LNP), отриманих за допомогою способу лінійного розбавлення, в якому третій резервуар, що містить буфер для розведення гідралічно сполучений з другою ділянкою змішення. У цьому варіанті реалізації, розчин ліпідних бульбашок (наприклад, ліпосом), утворений у першій зоні змішування, відразу ж змішували з буфером для розведення у другій зоні змішування. У бажаних аспектах, друга зона змішування містить Т-образний елемент, розташований таким чином, що потоки розчину ліпідних бульбашок і буфера з'єднуються як протилежні на 180° потоки; проте, з'єднувальні елементи, що забезпечують малий кут ковзання, можуть бути використані, наприклад, від близько 27° до 180° (наприклад, близько 90°). Насосний механізм забезпечує контрольований потік буфера до другої області змішування. В одному аспекті, швидкість потоку буфера розведення, що подається в другу зону змішування, контролюється так, щоб бути по суті рівною швидкості потоку розчину ліпідних

бульбашок, введеного у нього з першого змішувача області. Цей варіант бажано забезпечує більший контроль потоку буфера розведення для змішування з розчином ліпідних бульбашок у другій зоні змішування, а отже, і концентрацію розчину ліпідних бульбашок у буфері протягом другого способу змішування. Такий контроль витрати буфера розведення переважно

5 забезпечує формування часток малого розміру при знижених концентраціях.

[0329] Ці процеси і апарати для проведення цих прямих лінійних розведень і процеси розведення детально описані в заявці на патент США № 2007/0042031, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

10 [0330] Нуклеїнові кислотні-ліпідні частки, що формуються з використанням прямого розбавлення і способів лінійного розбавлення, як правило, мають розмір від близько 30 нм до близько 150 нм, від близько 40 нм до близько 150 нм, від близько 50 нм до близько 150 нм, від близько 60 нм до близько 130 нм, від близько 70 нм до близько 110 нм, від близько 70 нм до близько 100 нм, від близько 80 нм до близько 100 нм, від близько 90 нм до близько 100 нм, від близько 70 нм до близько 90 нм, від близько 80 нм до близько 90 нм, від близько 70 нм до близько 80 нм, менше ніж близько 120 нм, 110 нм, 100 нм, 90 нм або 80 нм або близько 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм, 120 нм, 125 нм, 130 нм, 135 нм, 140 нм, 145 нм, або 150 нм (або будь-яку їх фракцію або діапазон у ньому). Частки, таким чином, не агрегують, і, необов'язково, формуються такого розміру, щоб досягти однорідного розміру часток.

20 [0331] За необхідності, розмір ліпідних часток за цим винаходом (наприклад, LNP) може бути розрахований за допомогою будь-якого зі способів, доступних для формування розміру ліпосом. Зміна розмірів може бути здійснена для того, щоб досягти бажаного розміру і відносно вузького розподілу часток за розмірами.

25 [0332] Деякі методи доступні для визначення розміру часток до потрібного розміру. Один із способів калібрування, що використовується для ліпосом і в рівній мірі застосовний до даної частки, описаний у патенті США № 4737323, опис якого включений у цьому документі шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Ультразвукова обробка суспензії часток або в ємності, або в зонді, призводить до поступового зменшення розмірів часток до менше ніж близько 50 нм у розмірі. Гомогенізація є ще одним способом, що ґрунтується на розділенні енергії фрагментів великих часток на дрібніші. У типовій процедурі гомогенізації, частки рециркулюють через стандартний емульсійний гомогенізатор до вибраних розмірів часток, які спостерігатимуться, як правило, між близько 60 і близько 80 нм. У обох способах, розподіл часток за розмірами можна контролювати за допомогою звичайного лазерного променя дискримінацію часток за розмірами, або QELS.

35 [0333] Екструзія часток через невеликі пори полікарбонатної мембрани або асиметричної керамічної мембрани є також ефективним способом зниження розмірів часток у відносно добре визначеному розподілі за розмірами. Як правило, суспензію циклічно пропускають через мембрану один або кілька разів до того часу, поки бажаний розподіл часток за розмірами не буде досягнутий. Частки можуть бути послідовно екструдовані через менші пори мембрани, щоб 40 досягти поступового зменшення розміру.

[0334] У деяких варіантах реалізації, нуклеїнові кислоти, присутні в частках, ресуспендовані, як описано, наприклад, у заявці на патент США 09/744103, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

45 [0335] В інших варіантах реалізації способи можуть додатково включати додавання неліпідних полікатіонів, які корисні для реалізації ліпофекації клітин з використанням даних композицій. Приклади прийнятних неліпідними полікатіонів охоплюють, гексаметрин бромід (продається під торгівельною маркою POLIBRENE®, від Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA) або інших солей гексаметрина. Інші прийнятні полікатіони охоплюють, наприклад, солі полі-L-орнітина, полі-L-аргініна, полі-L-лізіна, полі-D-лізіна, поліліліаміна і поліетиленіміна. Додавання цих солей відбувається, бажано, після того, як частки були сформовані.

50 [0336] У деяких варіантах реалізації нуклеїнова кислота в співвідношенні з ліпідом (мас./мас. співвідношення) утворює нуклеїнову кислотну-ліпідну частку (наприклад, LNP), яка знаходиться в інтервалі від близько 0,01 до близько 0,2, від близько 0,05 до близько 0,2, від близько 0,02 до 55 близько 0,1, від близько 0,03 до близько 0,1 або від близько 0,01 до близько 0,08. Співвідношення первинних матеріалів (що вносяться) також потрапляє у вказаний діапазон. В інших варіантах реалізації препарат часток використовує близько 400 мкг нуклеїнової кислоти на 10 мг загального ліпиду або масове співвідношення нуклеїнової кислоти до ліпиду складає від близько 0,01 до близько 0,08 і, бажаніше, близько 0,04, що відповідає 1,25 мг загального ліпиду 60 на 50 мкг нуклеїнової кислоти. В інших бажаних варіантах реалізації частка має масове

співвідношення нуклеїнова кислота:ліпід близько 0,08.

[0337] У інших варіантах реалізації співвідношення ліпиду до нуклеїнової кислоти (мас./мас. співвідношення) в утвореній нуклеїновій кислотно-ліпідній частці (наприклад, LNP) варіюватиметься від близько 1 (1:1) до близько 100 (100:1), від близько 5 (5:1) до близько 100 (100:1), від близько 1 (1:1) до близько 50 (50:1), від близько від 2 (2:1) до близько 50 (50:1), від близько 3 (3:1) до близько 50 (50:1), від близько 4 (4:1) до близько 50 (50:1), від близько 5 (5:1) до близько 50 (50:1), від близько 1 (1:1) до близько 25 (25:1), близько від 2 (2:1) до близько 25 (25:1), від близько 3 (3:1) до близько 25 (25:1), від близько 4 (4:1) до близько 25 (25:1), від близько 5 (5:1) до близько 25 (25:1), від близько 5 (5:1) до близько 20 (20:1), від близько 5 (5:1) до близько 15 (15:1), від близько 5 (5:1) до близько 10 (10:1), або близько 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), або 25 (25:1), або будь-якої їх фракції або діапазону в ньому. Співвідношення первинних матеріалів (що вносяться) також потрапляє у вказаний діапазон.

[0338] Як описано вище, кон'югований ліпід може додатково містити CPL. Різноманітність загальних способів одержання LNP-CPL (LNP, що містить CPL) обговорюються у цьому документі. Два загальні способи охоплюють техніку "після вставки", тобто вставку CPL у, наприклад, заздалегідь сформований LNP і "стандартний" спосіб, в якому CPL включають у ліпідну суміш протягом, наприклад, кроків формування LNP. Пост-вставний спосіб призводить до LNP, що містить CPLs, основному на зовнішній поверхні двошарової мембрани LNP, тоді як стандартні способи забезпечують LNP, що містять CPLs, на внутрішніх і зовнішніх поверхнях. Цей спосіб особливо корисний для бульбашок, виготовлених із фосфоліпідів (які можуть містити холестерин), а також для бульбашок, що містять PEG-ліпіди (наприклад, PEG-Daas і PEG-DAG). Способи одержання LNP-CPLS розкриті, наприклад, у патентах США №№ 5705385; 6586410; 5981501; 6534484 і 6852334; патентній заявці США № 2002/0072121; і публікації PCT № WO 00/62813, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

VII. Набори

[0339] Цей винахід також надає ліпідні частки (наприклад, LNP) у формі набору. У деяких варіантах реалізації набір містить контейнер, який розділений для вмісту різних елементів ліпідних часток (наприклад, активних агентів або терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти і окремі ліпідні компоненти часток). Бажано, щоб набір містив контейнер (наприклад, флакон або ампулу), що містить ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP), який відрізняється тим, що частки одержують по одному із способів, викладених у цьому документі. У деяких варіантах реалізації набір може додатково містити дестабілізатори ендосомальних мембран (наприклад, іони кальцію). Набір зазвичай містить частки композиції за цим винаходом або у вигляді суспензії у фармацевтично прийнятному носіїві, або в дегідратованій формі, з інструкціями по їх регідратації (у разі ліофілізованих) і введення.

[0340] Ліпідні частки за цим винаходом можуть бути пристосовані переважно для ураження конкретної тканини, органу або пухлині, що представляють інтерес. В деяких випадках, 1:57 композиція ліпідної частки (наприклад, LNP) може бути використана для ураження переважно печінки (наприклад, нормальної тканини печінки). В інших випадках, 7:54 композиція ліпідної частки (наприклад, LNP) може бути використана для ураження переважно твердих пухлин, таких як пухлини печінки і пухлини за межами печінки. У бажаних варіантах реалізації набори за цим винаходом містять такі печінка-вражаючі та/або пухлина-вражаючі ліпідні частки, в яких частки присутні в контейнері у вигляді суспензії або в дегідратованій формі.

[0341] У деяких інших випадках, може бути бажано, мати фрагмент-мішень, прикріплений до поверхні ліпідної частки для подальшого підвищення вражаючої здатності частки. Способи кріплення фрагмента-мішені (наприклад, антитіла, білка і так далі), до ліпідів (таким, як ті, що використовуються у данній частці) відомі фахівцям у цій області техніки.

VIII. Введення ліпідних часток

[0342] Після формування, ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть бути використані для введення активних агентів або терапевтичних агентів (наприклад, нуклеїнових кислот, таких як інтерферуючі РНК) у клітини. Таким чином, цей винахід також відноситься до способів введення активної речовини або терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК) у клітину. В деяких випадках, клітина є клітиною печінки, такою як, наприклад, гепатоцит, який присутній у тканині печінки. В інших випадках, клітина є пухлинною клітиною, такою як, наприклад, пухлинна клітина, що присутня у твердій пухлині. Способи здійснюються in vitro або in vivo, спочатку відбувається утворення частки, як описано вище, і потім контакт часток із клітинами протягом періоду часу, достатнього для того, щоб

відбулася доставка активного агента або терапевтичного агента до клітин.

[0343] Ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть бути адсорбовані на майже будь-якому типі клітин, з якими вони змішуються або вступають у контакт. Після адсорбції, частки можуть бути піддані або ендоцитозу частиною клітин, обміну ліпідами з клітинними мембранами, або злиттю з клітинами. Передача або введення активного агента або терапевтичного агента (наприклад, нуклеїнової кислоти) порції часток може проходити через будь-який один з цих шляхів. Зокрема, коли відбувається злиття, мембрана часток є інтегрованою в клітинну мембрану і містити частку у поєднанні з внутрішньоклітинною рідиною.

[0344] Ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть бути введені або окремо, або в суміші з фармацевтично прийнятним носієм (наприклад, фізіологічним розчином або фосфатним буфером), вибраним відповідно до шляху введення і стандартної фармацевтичної практики. Як правило, нормальний сольовий буфер (наприклад, 135-150 mM NaCl), буде використаний як фармацевтично прийнятний носій. Інші прийнятні носії охоплюють, наприклад, воду, буферну воду, 0,4% сольовий розчин, 0,3% гліцин і тому подібні, у тому числі глікопротеїни для підвищення стабільності, такі як альбумін, ліпопротеїн, глобулін і так далі. Додаткові прийнятні носії описані, наприклад, у REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). Як використано в цьому документі, "носії" охоплює будь-який і всі розчинники, дисперсійні середовища, транспортні засоби, покриття, розчинники, антибактеріальні і протигрибкові агенти, ізотонічні і затримуючі всмоктування агенти, буфери, розчини, суспензії носія, колоїди, і тому подібні. Фраза "фармацевтично прийнятний" відноситься до молекулярних часток і композицій, які не продукують алергічну або подібну несприятливу реакцію при введенні людині.

[0345] Фармацевтично прийнятний носій зазвичай додають після утворення ліпідної частки. Таким чином, після того, як ліпідна частка (наприклад, LNP) формується, частка може бути розбавлена у фармацевтично прийнятному носії, такому як нормальний сольовий буферний розчин.

[0346] Концентрація часток у фармацевтичних препаратах може широко варіювати, тобто від менше ніж близько 0,05 %, як правило, на рівні або, щонайменше близько від 2 до 5 %, до близько від 10 до 90 % по масі, і будуть обрані, перш за все, за об'ємом рідини, в'язкістю і тому подібне, відповідно до конкретного способу введення. Наприклад, концентрація може бути збільшена, щоб знизити навантаження рідини, пов'язане з лікуванням. Це може бути особливо бажаним у пацієнтів, які мають атеросклероз, асоційований із застійною серцевою недостатністю або важкою гіпертензією. З іншого боку, частки, що складаються із ліпідів, що викликають роздратування, можуть бути розбавлені до низьких концентрацій, щоб зменшити запалення у місці введення.

[0347] Фармацевтичні композиції за цим винаходом можуть бути стерилізовані за допомогою звичайних, добре відомих способів стерилізації. Водні розчини можуть бути упаковані для використання або профільтовані в асептичних умовах і ліофілізовані, ліофілізований препарат об'єднують із стерильним водним розчином перед введенням. Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як коректори pH і буферні агенти, агенти, що регулюють тонічність, і тому подібні, наприклад, ацетат натрію, лактат натрію, хлорид натрію, хлорид калію і хлориду кальцію. Крім того, суспензія часток може містити ліпідні захисні агенти, які захищають ліпіди від вільних радикалів і ліпід-перекисних пошкоджень при зберіганні. Ліпофільні безрадикальні гасителі, такі як альфатокоферол, і розчинні у воді залізо-специфічні хелатори, такі як ферріоксамін, є прийнятними.

[0348] У деяких варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) є особливо корисними у способах терапевтичної доставки одного або декількох нуклеїнових кислот, що містять послідовність інтерферуючої РНК (наприклад, міРНК). Зокрема, завданням цього винаходу є забезпечення способів *in vitro* і *in vivo* лікування захворювань або розладів у ссавця (наприклад, гризунів, таких як миші, або приматів, таких як людина, шимпанзе, або мавпа) за допомогою виключення або придушення транскрипції та/або трансляції однієї або більше цільової послідовності нуклеїнових кислот або генів, що представляють інтерес. Як необмежуючий приклад, способи за винаходом можуть бути використані для доставки *in vivo* інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК) у печінку і в пухлину у ссавця. У конкретному варіанті реалізації, захворювання або розлад є асоційованим з експресією та/або надекспресією гена і експресією або надекспресією гена, що знижена інтерферуючою РНК (наприклад, міРНК). У конкретному варіанті реалізації, терапевтично ефективна кількість ліпідної частки може бути введена ссавцеві. В деяких випадках, інтерферуюча РНК (наприклад, міРНК) поміщена в LNP, і частки вводяться пацієнтові, який потребує такого лікування. В інших випадках, клітини

вилучають у пацієнта, інтерферуючі РНК доставляються *in vitro* (наприклад, з використанням LNP, описаних у цьому документі), і клітини назад вводяться пацієнтові.

A. Введення *in vivo*

[0349] Системна доставка для терапії *in vivo*, наприклад, доставка терапевтичної нуклеїнової кислоти в дистальну клітину-мішень за допомогою систем організму, таких як циркуляція, була досягнута з використанням часток нуклеїнових кислот, ліпідів, таких як ті, які описані в публікаціях РСТ №№ WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 і WO 04/002453, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Цей винахід також надає повністю інкапсульовані частки ліпідів, які захищають нуклеїнову кислоту від деградації нуклеазою в сироватці, які є неімуногенними, невеликими за розміром, і які є прийнятними для повторної дози.

[0350] Для введення у природних умовах, введення може бути здійснене будь-яким способом, відомим у даній області, наприклад, за допомогою ін'єкції, перорального введення, інгаляції (наприклад, інтраназальної або інтратрахеальної), трансдермального застосування, або ректального введення. Введення може бути здійснене за допомогою однієї або декількох доз. Фармацевтичні композиції можуть бути введені парентерально, тобто, інтраартикулярно, внутрішньовенно, внутрішньочеревно, підшкірно або внутрішньом'язово. У деяких варіантах реалізації, фармацевтичні композиції вводять внутрішньовенно або внутрішньочеревно за допомогою ін'єкції ударної дози (див., наприклад, патент США № 5286634). Внутрішньоклітинна доставка нуклеїнової кислоти також обговорювалася в Straubinger et al., *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino et al., *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); i Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993). Проте, інші способи введення ліпідів на основі терапевтичних засобів описані, наприклад, у патентах США № 3993754; 4145410; 4235871; 4224179; 4522803; і 4588578. Частки ліпідів можуть бути введені шляхом прямої ін'єкції в місце хвороби або у вигляді ін'єкцій у вузлі, дистальному від місця захворювання (див., наприклад, Culver, *HUMAN GENE THERAPY*, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp.70-71(1994)). Розкриття описаних вище посилань включені в даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0351] У варіантах реалізації, де ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) вводять внутрішньовенно, щонайменше близько 5%, 10%, 15%, 20%, або 25% від загального об'єму ін'єкції дози часток присутні в плазмі через близько 8, 12, 24, 36, або 48 год після ін'єкції. В інших варіантах реалізації, більше ніж близько 20%, 30%, 40% і до порядку 60%, 70% або 80% від загального введеної дози ліпідних часток були присутні в плазмі крові через близько 8, 12, 24, 36, або 48 год після ін'єкції. У деяких випадках більше ніж близько 10% від множини часток присутні в плазмі ссавця через близько 1 годину після введення. У деяких інших випадках, присутність часток ліпідів можна виявити принаймні близько через 1 годину після введення часток. У деяких варіантах реалізації, наявність терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота, можна виявити в клітинах легенів, печінці, пухлині, або у місці запалення через близько 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 або 96 годин після введення. В інших варіантах реалізації, виключення експресії послідовності-мішені за допомогою інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК) можна виявити близько через 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 або 96 годин після введення. В інших варіантах реалізації, придушення експресії послідовності-мішені за допомогою інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК) відбувається переважно в клітинах печінки (наприклад, гепатоцитах), пухлинних клітинах, або в клітинах в області запалення. В інших варіантах реалізації, наявність або ефект інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК) можна виявити в клітинах на місці, проксимальному або дистальному до місця введення або в клітинах легенів, печінці або пухлині через близько 12, 24, 48, 72 або 96 годин, або через близько 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 або 28 днів після введення. У додаткових варіантах реалізації ліпідні частки (наприклад, LNP) за цим винаходом вводять парентерально або внутрішньочеревно.

[0352] Композиції за цим винаходом або окремо, або в комбінації з іншими прийнятними компонентами, можуть бути перетворені на аерозольні препарати (наприклад, вони можуть бути "розпилюваними") для введення за допомогою інгаляції (наприклад, інтраназально або внутрішньотрахеально) (див., Brigham et al., *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)). Аерозольні препарати можуть бути поміщені під тиском у прийнятні пропеленти, такі як дихлордифторметан, пропан, азот і тому подібне.

[0353] У деяких варіантах реалізації, фармацевтичні композиції можуть бути доставлені за допомогою інтраназальних спреїв, інгаляцій, та/або інших транспортних засобів аерозольної доставки. Способи доставки композиції нуклеїнових кислот безпосередньо в легені через носові аерозолі були описані, наприклад, у патентах США №№ 5756353 і 5804212. Так само, доставка лікарських засобів із використанням інтраназальних мікрочасток смоли і лізофосфатидил-

гліцеринових сполук (патент США 5725871) також добре відомі у фармацевтичній області. Крім того, доставка лікарського засобу через слизову оболонку у формі опорної політетрафлюоретеїленової матриці описана в патенті США № 5780045. Розкриття описаних вище патентів включені в даний опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0354] Композиції, придатні для парентерального введення, такі як, наприклад, шляхом внутрішньосуглобного (у суглоби), внутрішньовенного, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, внутрішньочеревного, і підшкірного, містять водні і неводні ізотонічні розчини, стерильні ін'єкційні, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні чинники, і розчинені речовини, які додають композиції ізотонічність з кров'ю передбачуваного реципієнта, а також водні і неводні стерильні суспензії, які можуть містити суспендуючі агенти, солюбілізатори, загусники, стабілізатори і консерванти. У практичному застосуванні цього винаходу, композиції бажано вводять, наприклад, шляхом внутрішньовенної інфузії, перорально, місцево, внутрішньочеревно, всередину сечового міхура, або інтратекально.

[0355] Як правило, при внутрішньовенному введенні, композиції ліпідних часток скомпоновані з прийнятним фармацевтичним носієм. Багато фармацевтично прийнятних носіїв можуть бути використані у композиціях і способах за цим винаходом. Прийнятні композиції для використання у цьому винаході можна знайти, наприклад, у REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). Можуть бути використані різні водні носії, наприклад, вода, забуферена вода, 0,4% сольовий розчин, 0,3% гліцин і тому подібне, а також можуть містити глікопротеїни для підвищення стабільності, такі як альбумін, ліпопротеїн, глобулін і так далі. Як правило, нормальний буферний сольовий розчин (135-150 mM NaCl), буде використаний як фармацевтично прийнятний носій, але достатньо і інших прийнятних носіїв. Ці композиції можуть бути стерилізовані способами звичайної ліпосомальної стерилізації, наприклад, фільтрацією. Ці композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, необхідні для наближення до фізіологічних умов, такі як коректуючі рН і буферні агенти, агенти, що коректують концентрацію, змочуючі агенти і тому подібне, наприклад, ацетат натрію, лактат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, монолаурат сорбіту, олеат триетаноламіну і так далі. Ці композиції можуть бути стерилізовані з використанням способів, вказаних вище, або, альтернативно, вони можуть бути виготовлені в стерильних умовах. Отримані водні розчини можуть бути упаковані для використання або профільтровані в асептичних умовах і ліофілізовані, ліофілізований препарат об'єднують із стерильним водним розчином перед введенням.

[0356] У деяких випадках, ліпідні частки, описані у цьому документі, можуть бути доставлені за допомогою перорального введення індивідуумові. Частки можуть бути об'єднані з ексципієнтами і використані у вигляді пігулок для прийому всередину, букальних пігулок, пастилок, капсул, пілюль, коржиків, еліксирів, рідини для полоскання рота, суспензії, спрею, сиропів, вафель і тому подібне (див., наприклад, патенти США №№ 5641515, 5580579, і 5792451, розкриття яких включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей). Ці пероральні лікарські форми можуть також містити: зв'язуючі речовини, желатин; наповнювачі, змашуючі речовини та/або ароматизатори. Коли одинична дозована форма є капсулою, вона може містити, на додаток до матеріалів, описаних вище, рідкий носій. Різні інші матеріали можуть бути присутніми у вигляді покриття або для модифікації фізичної форми дозованої одиниці. Звичайно, будь-який матеріал, використаний для приготування будь-якої лікарської форми, має бути фармацевтично чистим і по суті нетоксичним у використаних кількостях.

[0357] Як правило, ці оральні препарати можуть містити щонайменше близько 0,1% ліпідних часток або більше, хоча доля часток може, звичайно, варіюватися і може складати від близько 1% або 2% до близько 60% або 70% або більше по масі або об'єму від загального об'єму композиції. Природньо, що кількість часток у кожній терапевтично корисній композиції, яка може бути приготована, є такою, що прийнятна доза буде отримана у будь-який момент з одиничної дози сполуки. Такі чинники, як розчинність, біодоступність, біологічний період напіврозпаду, шляхи введення, термін придатності продукту, а також інші фармакологічні міркування будуть зрозумілі фахівцям у даній області одержання таких фармацевтичних композицій, і, як такі, різні дозування і схеми лікування можуть бути бажаними.

[0358] Композиції, придатні для перорального введення, можуть містити: (а) рідкі розчини, такі як ефективна кількість упакованого терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК), суспендовані в розчинниках, таких як вода, сольовий розчин, або PEG 400; (b) капсули, саше або пігулки, кожна з яких містить заздалегідь визначену кількість терапевтичного агента, такого як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК), у вигляді рідин, твердих речовин, гранул, або желатину; (c) суспензії у відповідній рідині; і (d) прийнятні

емульсії. Таблетовані форми можуть містити один або більше компонентів з лактози, сахарози, маніту, сорбіту, фосфату кальцію, кукурудзяного крохмалю, картопляного крохмалю, мікрокристалічної целюлози, желатину, колоїдного діоксиду кремнію, тальку, стеарату магнію, стеаринової кислоти, і інші допоміжні речовини, барвники, наповнювачі, єднальні речовини, розчинники, буферні агенти, зволожуючі агенти, консерванти, віддушки, барвники, розпушувачі і їх фармацевтично сумісні носії. Таблетовані форми можуть включати терапевтичний агент, такий як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК) з ароматизатором, наприклад, сахарозою, а також пастилки, що містять терапевтичний агент в інертній основі, такий як емульсія, гель і тому подібне, що містить желатин і гліцерин, або сахарозу і гуміарабік, що містить, на додаток до терапевтичного агента, носії, відомі у даній області.

[0359] В іншому прикладі їх використання, ліпідні частки можуть бути включені у широкий діапазон актуальних лікарських форм. Наприклад, суспензія, що містить частки нуклеїнових кислот, ліпідів, такі як LNP, може бути виготовлена і введена у вигляді гелів, масел, емульсій, кремів, паст, мазей, лосьйонів, пін, мусси, і тому подібного.

[0360] При приготуванні фармацевтичних препаратів з ліпідних часток за цим винаходом, бажано використовувати кількість часток, які були очищені, щоб зменшити або усунути порожні частки або частки з терапевтичними агентами, наприклад, нуклеїновими кислотами, пов'язаними із зовнішньою поверхнею.

[0361] Способи за цим винаходом можуть бути реалізовані в різних господарях. Бажані господарі охоплюють види ссавців, таких як примати (наприклад, людини і шимпанзе, а також інших приматів), псових, тварин із сімейства котячих, коней, корів, овець, кіз, гризунів (наприклад, щурів і мишей), зайцеподібних і свиней.

[0362] Кількість часток, що вводяться, залежатиме від співвідношення терапевтичного агента (наприклад, нуклеїнових кислот) до ліпідів, особливо від використаного терапевтичного агента (наприклад, нуклеїнової кислоти), захворювання або розладу, який лікують, віку, маси і стану хворого, і рішення лікаря, але зазвичай складає від близько 0,01 до близько 50 мг на кілограм маси тіла, бажано від близько 0,1 до близько 5 мг/кг маси тіла, або близько 10^8 - 10^{10} часток на введення (наприклад, ін'єкції).

В. Введення in vitro

[0363] Для застосування in vitro, доставка терапевтичних агентів, таких як нуклеїнові кислоти (наприклад, інтерферуючі РНК) може бути зроблена в будь-яку клітину, вирощену в культурі, будь вона рослинного або тваринного походження, хребетних і безхребетних, і з будь-якої тканини або типа. У бажаних варіантах реалізації клітини є клітинами тварин, бажаніше клітинами ссавців, і найбажаніше клітинами людини (наприклад, пухлинні клітини або гепатоцити).

[0364] Контакт між клітинами і ліпідними частками, коли він здійснюється в умовах in vitro, відбувається в біологічно сумісному носії. Концентрація часток варіюється в широких межах залежно від конкретного застосування, але зазвичай складає від близько 1 мкмоль до близько 10 ммоль. Лікування клітин ліпідними частками зазвичай проводять при фізіологічних температурах (близько 37°C) протягом періоду часу від близько 1 до 48 годин, бажано від близько 2 до 4 годин.

[0365] В одній групі бажаних варіантів реалізації у суспензію ліпідних часток додається 60-80% поєднаних покриваючих клітин, що мають щільність клітин від близько 10^3 до близько 10^5 клітин/мл, бажаніше близько 2×10^4 клітин/мл. Концентрація доданої до клітин суспензії складає, бажано, від близько 0,01 до 0,2 мкг/мл, бажаніше близько 0,1 мкг/мл.

[0366] Випадки, коли тканинні культури клітин можуть бути необхідними, добре відомі у даній області техніки. Наприклад, Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977), і наведені там посилання дають загальне керівництво по культурі клітин. Культивовані клітинні системи часто будуть у вигляді моношарів клітин, хоча також використовуються клітинні суспензії.

[0367] Використання аналізу Ендосомального Параметра Вивільнення (ERP) може оптимізувати ефективність доставки LNP або інших ліпідних часток за цим винаходом. ERP-аналіз детально описаний у заявці на патент США № 2003/0077829, розкриття якої включене у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей. Конкретніше, мета ERP аналізу полягає в можливості розрізнати вплив різних катіонних ліпідів і допоміжних ліпідних компонентів LNP або інших ліпідних часток на основі їх відносного впливу на зв'язування/поглинання або злиття з/дестабілізацію ендосомної мембрани. Цей аналіз дозволяє визначити кількісно, як кожен компонент LNP або інших ліпідних часток впливає на ефективність доставки і, таким чином, оптимізувати LNP або інші ліпідні частки. Як правило, ERP-аналіз

вимірює експресію репортерного білка (наприклад, люциферази β -галактозидази, зеленого флуоресцентного білка (GFP), і так далі), а в деяких випадках, LNP препарат, оптимізований для експресії плазміди, також може бути доцільним для інкапсуляції інтерферуючих РНК. У інших випадках, ERP-аналіз може бути виконаний з можливістю виміру знижуючої регуляції транскрипції або трансляції послідовності-мішені в присутності або у відсутності інтерферуючих РНК (наприклад, міРНК). При порівнянні ERP для кожного з різних LNP або інших ліпідних часток, можна легко визначити оптимізовану систему, наприклад, LNP або інших ліпідних часток, яка має найбільше поглинання у клітині.

C. Клітини для доставки ліпідних часток

[0368] Композиції і способі за цим винаходом використовуються для лікування широкого спектру типів клітин, *in vivo* і *in vitro*. Прийнятні клітини охоплюють гепатоцити, ретикуло-ендотеліальні клітини (наприклад, моноцити, макрофаги і так далі), фібробласти, ендотеліальні клітини, клітини тромбоцитів, інші типи клітин, інфіковані і чутливі до інфекції вірусами, гемопоетичні попередники (стволові) клітини, кератиноцити, скелетні і гладкі м'язові клітини, остеобласти, нейрони, лімфоцити, що покоються, термінально диференційовані клітини, повільні або нециклічні первинні клітини, паренхімні клітини, лімфоїдні клітини, епітеліальні клітини, кісткові клітини, і тому подібні, але не обмежуються ними.

[0369] У конкретних варіантах реалізації активний агент або терапевтичний засіб, такий як нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК), надходить у ракові клітини (наприклад, клітини твердої пухлини), у тому числі клітини раку печінки, клітини раку легенів, раку товстої кишки, клітини раку прямої кишки, анальні ракові клітини, ракові клітини жовчних проток, клітини раку малої кишки, ракові клітини живота (шлунку), ракові клітини стравоходу, ракові клітини жовчного міхура, ракові клітини підшлункової залози, ракові клітини апендикса, ракові клітини грудей, ракові клітини яєчників, ракові клітини шийки матки, ракові клітини простати, ракові клітини нирки, ракові клітини центральної нервової системи, пухлинні клітини гліобластоми, ракові клітини шкіри, клітини лімфоми, клітини хоріокарциноми, клітини раку голови і шиї, ракові клітини остеогенної саркоми, і ракові клітини крові, але не обмежуються ними.

[0370] *In vivo* доставка ліпідних часток, таких як LNP інкапсульована нуклеїнова кислота (наприклад, інтерферуюча РНК) є прийнятною для ураження клітин будь-якого типу. Способи і композиції можуть бути використані з клітинами широкого спектру хребетних, у тому числі ссавців, таких як, наприклад, псові, тварини сімейства котячих, коні, корови, вівці, кози, гризуни (наприклад, миші, щури і морські свинки), зайцеподібні, свині, і примати (наприклад, мавпи, шимпанзе і люди).

D. Виявлення ліпідних часток

[0371] У деяких варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть бути виявлені у суб'єкта через близько 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або більше годин. У інших варіантах реалізації, ліпідні частки за цим винаходом (наприклад, LNP) можуть бути виявлені у суб'єкта через близько 8, 12, 24, 48, 60, 72 або 96 годин, або близько 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, або 28 днів після введення часток. Наявність часток може бути виявлена у клітині, тканині або інших біологічних зразках суб'єкта. Частки можуть бути виявлені, наприклад, шляхом прямого виявлення часток, виявленням терапевтичної нуклеїнової кислоти, такої як інтерферуючі РНК (наприклад, міРНК) послідовності, виявленням послідовностей-мішеней (наприклад, шляхом визначення експресії або зниження експресії послідовності, що цікавить), або їх комбінації.

1. Виявлення часток

[0372] Ліпідні частки за цим винаходом, такі як LNP, можуть бути виявлені за допомогою будь-якого способу, відомого у даній області. Наприклад, мітка може бути приєднана безпосередньо або опосередковано до компонента ліпідної частки з використанням способів, добре відомих у даній області. Можна використовувати широкий вибір міток. Вибір мітки залежить від необхідної чутливості, простоти сполучення з компонентом ліпідної частки, вимог до стійкості і доступних положень приладів і утилізації. Прийнятні мітки охоплюють спектральні мітки, такі як флуоресцентні барвники (наприклад, флуоресцеїн і його похідні, такі як флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC) і Oregon Green™; родамін і його похідні, такі як Техаський червоний, тетрародимін ізотіоціанат (TRITC), і так далі, дигоксигенін, біотин, фікоеритрин, AMCA, CyDyes™, і тому подібне; радіоактивні мітки, такі як ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , і т. д.; ферменти, такі як пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, і т.д.; спектральні колориметричні мітки, такі як колоїдне золото або кольорове скло, або пластикові кульки, такі як полістирол, поліпропілен, латекс і тому подібні, але не обмежуються ними. Мітки можуть бути виявлені за допомогою будь-яких засобів, відомих у даній області.

2. Виявлення нуклеїнових кислот

[0373] Нуклеїнові кислоти (наприклад, інтерферуючі РНК) виявлені і визначені кількісно у цьому описі за допомогою будь-якого з множини способів, добре відомих фахівцям у даній області. Виявлення нуклеїнових кислот може відбуватися за допомогою добре відомих способів, таких як Саузерн-блоттінг, Нозерн-блоттінг, гель-електрофорез, PCR, радіомічення, сцинтиляційного підрахунку і афінної хроматографії. Також можуть бути використані додаткові аналітичні біохімічні методи, такі як спектрофотометрія, рентгенографія, електрофорез, капілярний електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), тонкошарова хроматографія (ТШХ), і гіпердифузійна хроматографія.

[0374] Вибір формату гібридизації нуклеїнових кислот не є критичним. Різні формати гібридизації нуклеїнових кислот відомі фахівцям у даній області техніки. Наприклад, поширені формати включають сендвіч-аналіз і конкурентний аналіз, або аналіз заміщення. Способи гібридизації, як правило, описані, наприклад, "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach", Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985).

[0375] Чутливість гібридизації може бути підвищена за рахунок використання системи ампліфікації нуклеїнової кислоти, яка мультиплікує нуклеїнову кислоту-мішень для виявлення. Відомі *in vitro* способи ампліфікації, придатні для ампліфікації послідовностей для використання як молекулярних зондів або для генерації фрагментів нуклеїнових кислот для подальшого субклонування. Приклади способів, достатніх для фахівця у даній області, такі як способи *in vitro*, у тому числі ампліфікація полімеразної ланцюгової реакції (PCR), у лігазну ланцюгову реакцію (LCR), ампліфікація Q β -реплікази та інші РНК-полімераза опосередковані способи (наприклад, NASBA™) знаходяться в Sambrook et al., у Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); і Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2002); а також у патенті США № 4683202; PCR протоколи, Керівництво за способами і застосуванню (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991); Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu and Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990); та Sooknanan and Malek, Biotechnology, 13:563 (1995). Удосконалені способи клонування *in vitro* ампліфікованої нуклеїнової кислоти описані в патенті США № 5426039. Інші способи, описані у даній області техніки на основі ампліфікованої послідовності нуклеїнової кислоти (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) і Q β -репліказні системи. Ці системи можуть бути використані для точного виявлення мутантів, де PCR або LCR праймери призначені для продовження або лігування лише тоді, коли вибрана послідовність присутня. Альтернативно, вибрана послідовність може бути як правило, ампліфікована з використанням, наприклад, неспецифічних праймерів PCR і ампліфікована ділянка-мішень пізніше зондується на предмет певної послідовності, що вказує на мутації. Розкриття описаних вище посилань включені у цей опис шляхом посилання у повному обсязі для всіх цілей.

[0376] Нуклеїнові кислоти для використання як зонди, наприклад, в *in vitro* способах ампліфікації, використовують як генні зонди або як інгібітор компонентів, як правило, хімічно синтезовані відповідно до твердої фази фосфорамідитного триєфірного способу, описаного Beaucage et al., Tetrahedron Letts., 22:1859 1862 (1981), наприклад, з використанням автоматичного синтезатора, як описано в Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984). Очищення полінуклеотидів, у разі потреби, як правило, виконується або нативним акриламідним гель-електрофорезом або аніонообмінною ВЕРХ, як описано в Pearson et al., J. Chrom., 255:137 149 (1983). Послідовність синтетичних полінуклеотидів може бути перевірена за допомогою способу хімічного розкладання в Maxam і Gilbert (1980) у Grossman і Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499.

[0377] Як альтернативний засіб для визначення рівня транскрипції *in situ*, виступає гібридизація. *In situ* гібридизаційний аналіз добре відомий і, як правило, описаний в Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987). В *in situ* гібридизації, клітини фіксують на твердому носії, зазвичай предметному склі. Якщо перевіряють ДНК, клітини денатурують при нагріванні або лузі. Потім клітини вводять у контакт з розчином для гібридизації при помірній температурі, щоб виконати відпалювання специфічних зондів, які помічені. Зонди бажано помічені радіоактивними ізотопами або люмінесцентними репортерами.

IX. Приклади

[0378] Цей винахід буде описаний детальніше за допомогою конкретних прикладів. Наступні приклади представлені з метою ілюстрації, і не призначені для обмеження винаходу жодним чином. Фахівці у даній області техніки легко зрозуміють множину некритичних параметрів, які

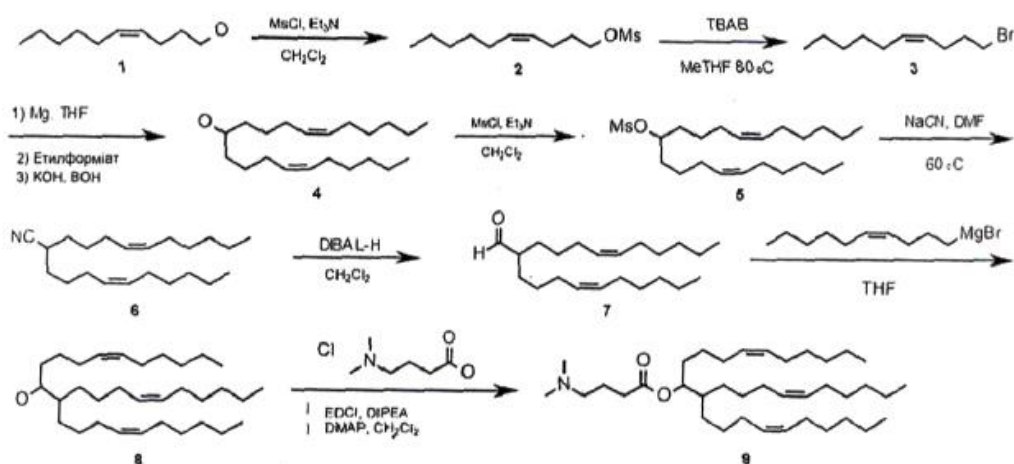
можуть бути змінені або модифіковані з одержанням, по суті, тих самих результатів.

[0379] Загальні способи: Всі реакції проводили при кімнатній температурі при позитивному тиску азоту, якщо не вказане інше. Всі реагенти були придбані з комерційних джерел і використовувалися без додаткового очищення. Хід реакції контролювали за допомогою TLC на силікагелі 60 F254 (0,25 мм, E. Merck). Плями були виявлені в УФ-випромінюванні або обвуглюванні плям анісовим альдегідом або сульфатом міді. Всі хроматографії на колонці проводили на силікагелі 60 (40-60мкм). Співвідношення між силікагелем і сирим продуктом знаходилося в діапазоні від 100 до 50:1. ^1H ЯМР спектри реєстрували при 300 Мгц або 400 Мгц і хімічні зрушення були внутрішньо прив'язані до залишкового протонованого розчинника (7,27 промілле CHCl_3). Органічні розчини концентрували у вакуумі при $< 40^\circ\text{C}$.

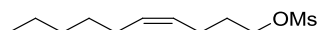
Приклад 1

[0380] У даному прикладі описаний синтез зразкових, триалкілових, катіонних ліпідів за цим винаходом.

Схема Синтезу для Сполуки 9

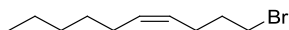


Синтез Сполуки 2



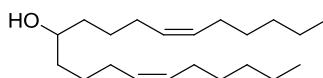
[0381] До охолодженого розчину (0°C) (Z)-дец-4-ен-1-ол 9 (20 г, 128,0 ммоль) і триетиламіна (26,7 мл, 191,9 ммоль) у безводному дихлорметані (200 мл) повільно додавали метансульфонілхлорид (14,9 мл, 191,9 ммоль). Розчин перемішували протягом 30 хв. при кімнатній температурі, потім розбавляли дихлорметаном (100 мл). Розчин промивали насиченим розчином бікарбонату натрію (3 x 150 мл) і потім об'єднані водні фракції екстрагували дихлорметаном (150 мл). Об'єднані екстракти дихлорметану сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок фільтрували через шар силікагеля (100% дихлорметан) із одержанням (Z)-дец-4-еніл метансульфоната 2 у вигляді жовтого масла (28,5 г, 95%). Rf 0,5 (100% CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 3



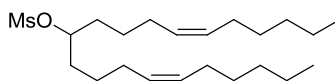
[0382] До розчину (Z)-дец-4-еніл метансульфоната 2 (28,5 г, 121,1 ммоль) у 2-метилтетрагідрофурані (280 мл) додавали бромід тетрабутиламонію (48,8 г, 151,4 ммоль). Розчин перемішували при 80°C протягом 30 хвилин в атмосфері азоту, потім розбавляли ефіром (150 мл) і промивали водою (75 мл) і насиченим розчином солі (75 мл). Ефірний розчин сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Блідо-жовте масло фільтрували через шар двоокису кремнію (100% гексан) із одержанням (Z)-1-бромдек-4-ена 3 у вигляді безбарвного масла (23,0 г, 87%). Rf 0,9 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 4



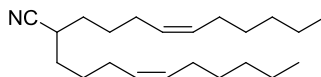
[0383] До суспензії магнієвої стружки (1,4 г, 55,1 ммоль) у безводному THF (6 мл) в атмосфері азоту повільно додавали розчин (Z)-1-бромодек-4-ена 3 (11,5 г, 52,5 ммоль) у THF (12 мл). Реакційну суміш перемішували при 45°C протягом 30 хвилин в атмосфері азоту. Розчин охолоджували до 0°C і додають розчин етилового ефіру мурашиної кислоти (4,1 г, 55,1 ммоль) у THF (12 мл) по краплях протягом 5 хвилин. Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім охолоджували до -15°C і гасили повільно водою (10 мл), потім 5 М хлористоводневою кислотою (15 мл). Після того, як магній повністю розчинився, розчин розбавляли водою (50 мл) і екстрагували гексаном (3x75 мл). Об'єднані екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насухо. Отриманий залишок розчиняли в етанолі (40 мл) і додавали розчин гідроксиду калію (4,4 г, 78,7 ммоль) у воді (10 мл). Реакційну суміш енергійно перемішували протягом 30 хв, потім концентрували у вакуумі, видаляючи етанол. Потім розчин підкислювали 5 М хлористоводневою кислотою (15 мл) і екстрагували гексаном (3 x 75 мл). Об'єднані екстракти гексанів сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насухо. Неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% гексан до 2,5% етилацетату в гексані) із одержанням (6Z, 15Z)-хенікоза 6,15-дієн-11-ола 4 у вигляді блідо-жовтого масла (5.6 г, 35%). Rf 0.4 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 5



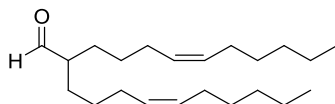
[0384] До охолодженого розчину (0°C) (6Z,15Z)-хенікоза-6,15-дієн-11-ола 4 (5.6 г, 18,2 ммоль) і триетиламіну (3,8 мл, 27,2 ммоль) у безводному дихлорметані (50 мл) повільно додавали метансульфонілхлорид (2,1 мл, 27,2 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі, потім розбавляли дихлорметаном (50 мл). Розчин промивали насиченим розчином бікарбонату натрію (3x25 мл), потім об'єднані водні фракції екстрагували дихлорметаном (50 мл). Об'єднані екстракти дихлорметану сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насухо. Блідо-жовте масло фільтрували через шар двоокиси кремнію (100 % DCM) із одержанням (6Z, 15Z)-хенікоза 6,15-дієн-11-іл метансульфоната 5 у вигляді неочищеного безбарвного масла (7.6 г). Rf 0.8 (100% CH₂Cl₂).

Синтез Сполуки 6



[0385] Розчин (6Z, 15Z)-хенікоза-6,15-дієн-11-іл метансульфоната 5 (7,6 г, 19,6 ммоль) і ціаніду натрію (4,8 г, 98,1 ммоль) у безводному DMF (60 мл) нагрівали до 60°C протягом ночі. Після закінчення, реакційну суміш виливали у воду (200 мл) і екстрагували етилацетатом (3x100 мл). Комбіновані етилацетатні екстракти промивали насиченим розчином солі (3x100 мл), сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насухо. Отриманий продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% гексани до 1% етилацетату в гексані) з одержанням (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-енітрила 6 у вигляді безбарвного масла (6.6 г, 97%). Rf 0.75 (10% EtOAc-гексани).

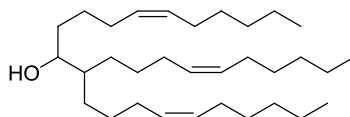
Синтез Сполуки 7



[0386] До охолодженого розчину (-78°C) (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-енітрил 6 (4,0 г, 12,6 ммоль) у безводному дихлорметані (125 мл) повільно додавали 1М розчин гібриду діізобутилалюмінію в гексані (5,6 мл, 31,5 ммоль). Розчин нагрівали до -15°C і перемішували протягом 1 години. Після завершення реакції реакційну суміш гасили 5% хлористоводневою кислотою (30 мл) і перемішували при -15°C, поки виділення водню не припинялося. Потім розчин розбавляли дихлорметаном (75 мл) і органічний шар промивали 5М хлористоводневою кислотою (100 мл). Діхлорметанові екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насухо. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії

(100% гексани до 2% етилацетату в гексанах) із одержанням (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-оля 7 у вигляді безбарвного масла (3.9 г, 97%). Rf 0.65 (5% EtOAc-гексани).

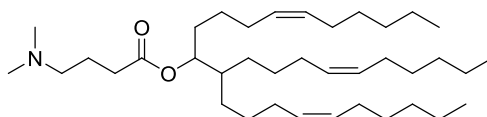
Синтез Сполуки 8



5

[0387] До суспензії магнієвої стружки (0,6 г, 23,9 ммоль) у тетрагідрофурані (5 мл) повільно додавали розчин (Z)-1-бромодек-4-ена 3 (4,5 г, 20,5 ммоль) у тетрагідрофурані (5 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, потім додавали розчин (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-оля 7 у тетрагідрофурані (5 мл). Розчин перемішували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі, потім виливали у 5% хлористоводневу кислоту (50 мл) і лід (100 мл). Розчин екстрагували ефіром (2x150 мл). Комбіновані ефірні екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії (1% етилацетат в гексанах) із одержанням (6Z,16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-ола 8 у вигляді безбарвного масла (4.8 г, 76%). Rf 0.45 (10% EtOAc-гексани).

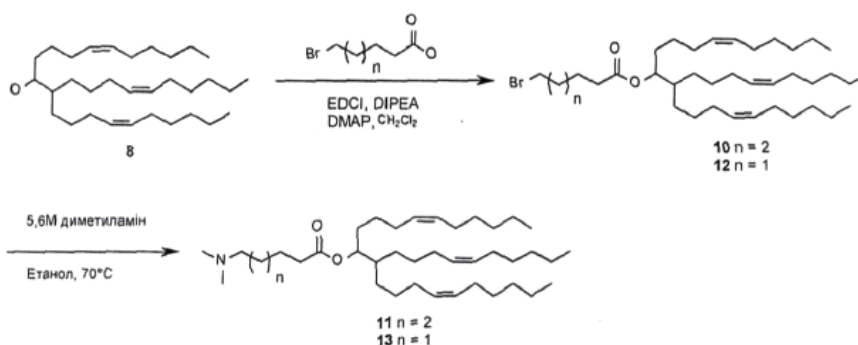
Синтез Сполуки 9



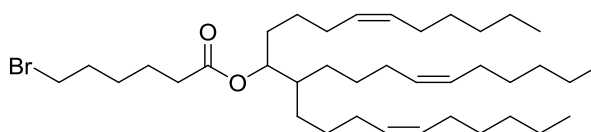
20

[0388] До розчину (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-ола 8 (0,4 г, 0,9 ммоль), 4-(диметиламіно)бутанової кислоти гідрохлориду (0,2 г, 1,3 ммоль), гідрохлориду EDCI (0,25 г, 1,3 ммоль), діізопропілетиламіна (0,4 мл, 2,6 ммоль) у безводному дихлорметані (10 мл) додавали диметиламінопіридин (5 мг). Розчин нагрівали із зворотним холодильником протягом 2 годин, потім перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Суміш концентрували у вакуумі насуху і очищали колонковою хроматографією (100% етилацетат) із одержанням 6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 9 у вигляді блідо-жовтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5.36 (м, 6H), 4.93 (м, 1H), 2.30 (м, 4H), 2.22 (с, 6H), 2.03 (м, 12H), 1.88 (м, 2H), 1.66-1.18 (м, 31H), 0.90 (м, 9H). Rf 0.3 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема Синтезу для Сполук 11 і 13



Синтез Сполуки 10



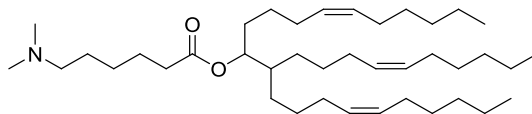
35

[0389] До розчину (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-ола 8 (2,4 г, 5,2 ммоль), 6-бромгексанової кислоти (1,5 г, 7,8 ммоль), EDCI гідрохлориду (1,5 г, 7,8 ммоль), діізопропілетиламіна (2,0 г, 15,6 ммоль) у безводному дихлорметані (25 мл) додавали диметиламінопіридин (15 мг). Розчин нагрівали із зворотним холодильником протягом 2 годин,

40

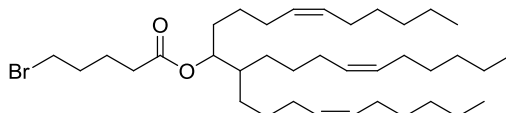
охолоджували до кімнатної температури і концентрували у вакуумі насуху. Реакційну суміш очищали за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі 60 (2" W x 10" л; елювання сумішшю 5% Етилацетат/гексан) з одержанням (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл-6 бромогексаноата 10 у вигляді безбарвного масла (3.1 г, 94%). Rf 0.5 (10% EtOAc-гексани).

5 Синтез Сполуки 11



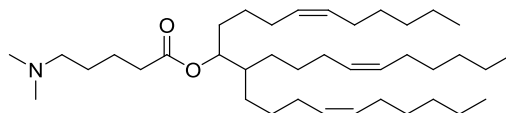
10 [0390] До (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 6-бромогексаноату 10 (3,1 г, 4,9 ммоль) у тефлоновій запечатаній ємності високого тиску був доданий 5,6 М диметиламін в етанолі (20 мл) і реакційну суміш нагрівали до 70°C і перемішували протягом ночі. Після завершення реакційну суміш концентрували у вакуумі насуху. Залишок розчиняли в етилацетаті (100 мл) і промивали розчином бікарбонату натрію (2 x 50 мл). Етилацетатний шар сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% Етилацетат) із одержанням (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 6-(диметиламіно)гексанової кислоти 11 у вигляді блідо-жовтого масла (2.0 г, 69%), ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5.36 (м, 6H), 4.93 (м, 1H), 2.27 (м, 10H), 2.00 (м, 12H), 1.63 (м, 6H), 1.51 (м, 6H), 1.28 (м, 25H), 0.90 (м, 9H). Rf 0.3 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

20 Синтез Сполуки 12



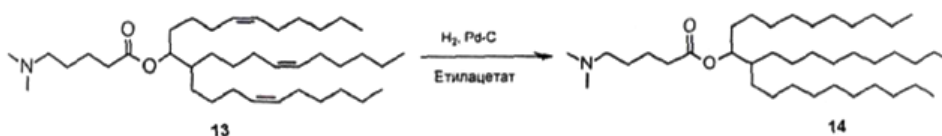
25 [0391] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл-6 бромогексаноата 10, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл-5 бромопентаноат 12 одержували у вигляді безбарвного масла (3,3 г, 61%) з (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-ола 8 (4,0 г, 8,7 ммоль), 6-бром-N-валеріанової кислоти (2,4 г, 13,0 ммоль), EDCI гідрохлорида (2,5 г, 13,0 ммоль), діізопропілетиламіна (3,4 г, 26,0 ммоль) і диметиламінопіридина (10 мг). Rf 0.5 (10% EtOAc-гексани).

30 Синтез Сполуки 13

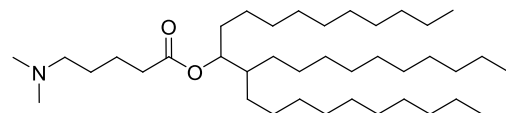


35 [0392] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 6-(диметиламіно)гексанової кислоти 11, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 5-(диметиламіно) пентанової кислоти 13 був отриманий у вигляді блідо-жовтого масла (1,9 г, 62%) з 5,6 М диметиламіну в етанолі (20 мл). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5.45-5.28 (м, 6H), 4.95-4.90 (м, 1H), 2.34-2.23 (м, 4H), 2.23-2.20 (с, 6H), 2.06-1.92 (м, 12H), 1.70-1.58 (м, 5H), 1.58-1.44 (м, 5H), 1.44-1.15 (м, 25H), 0.92-0.87 (м, 9H). Rf 0.4 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

40 Схема Синтезу для Сполуки 14

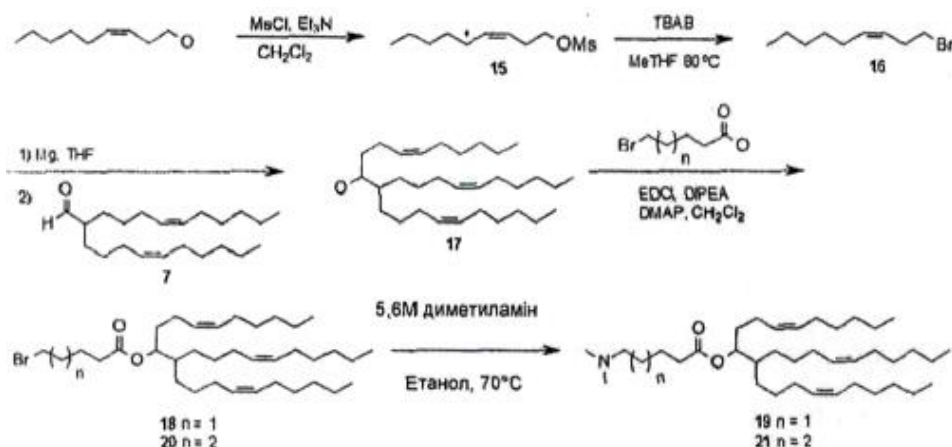


Синтез Сполуки 14



[0393] У колбу, що містить (6Z,16Z)-12-((Z)-нон-4-ен-1-іл)-трикоза 6,16-дієн-11-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 13 (200 мг, 0,34 ммоль) відкачували і знову заповнювали азотом (двічі), потім обробляли Pd/C (150 мг, 10 мас./мас.%), а потім суспендують в EtOAc (10 мл). Реакційну колбу потім відкачують і назад заповнюють H₂ (3х) і суміш енергійно перемішували (18 год). H₂ потім відкачують і колбу знову наповнюють N₂. Реакційну суміш фільтрували через целіт, промиваючи фільтрувальний коржик етилацетатом, і фільтрат концентрували. Сирий продукт піддають хроматографії (етилацетат) із одержанням 12-нонілтрикозан-11-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 14 (100 мг, 50%) у вигляді безбарвного масла. R_f 0,35 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂); ¹H ЯМР (400МГц, CDCl₃, δ_H) 4,95-4,90 (м, 1H), 2,31 (т, 2H), 2,27 (т, 2H), 2,21 (с, 6H), 1,68-1,60 (м, 3H), 1,58-1,42 (м, 5H), 1,38-1,16 (м, 54H), 0,88 (т, 6H).

Схема Синтезу для Сполуки 19 і 21

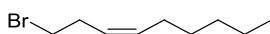


Синтез Сполуки 15



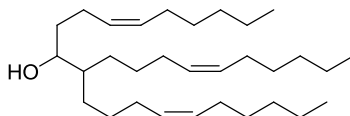
[0394] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (Z)-дец-4-еніл метансульфоната 2, (Z)-нон-3-еніл метансульфонат 15 одержували у вигляді жовтого масла (28,5 г, 92%) з (Z)-нон-3-ен-1-ола (20,0 г, 128,0 ммоль), триетиламіну (26,7 мл, 191,9 ммоль) і метансульфонілхлорида (14,9 мл, 191,9 ммоль). R_f 0.15 (30% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 16



[0395] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (Z)-1-бромодец-4-ена 3, (Z)-1-бромонон-3-ен 16 одержували у вигляді безбарвного масла (27.0 г, кількісно) з (Z)-дец-4-еніл метансульфоната 15 (28.5 г, 129 ммоль) і тетрабутиламоній броміду (52.0 г, 161.4 ммоль). R_f 0.6 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 17

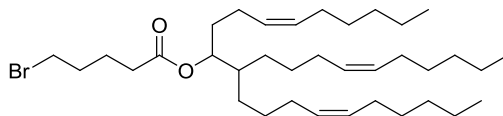


[0396] У 100-мл круглодонну колбу поміщали магнієву стружку (0,6 г, 25,7 ммоль) і мішалку. Колбу висушували з використанням фену протягом 5 хвилин. У колбу завантажують THF (5 мл) і одне зерно йоду. Додавали розчин (Z)-1-бромонон-3-ена (4,5 г, 22,0 ммоль) у THF (5 мл) повільно до суміші і реакційну суміш кип'ятили із зворотним холодильником протягом 30 хвилин в атмосфері азоту. Розчин охолоджували до кімнатної температури, і розчин (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-аля 7 (4,7 г, 14,7 ммоль) був доданий у THF (5 мл). Розчин перемішували протягом ночі при кімнатній температурі і після закінчення суміш виливали в 5% HCl (50 мл) і льоду (100 мл). Розчин екстрагували ефіром (2 x 150 мл), і об'єднані ефірні екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок очищали за допомогою

колонкової хроматографії (колонка: 2 "W" x 8 л; з елюванням 100% гексани до 5% етилацетату в гексанах) із одержанням (6Z, 15Z)-11-((Z)-4-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-ола 17 у вигляді безбарвного масла (5.4 г, 82%). Rf 0.5 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 18

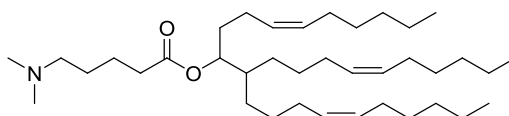
5



[0397] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z,16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл-6 бромогексаноата 10 (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-іл-5 бромопентаноат 18 одержують у вигляді безбарвного масла (0,9 г, 66%) з (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-ола 17 (0,35 г, 0,7 ммоль), 5-бром-N-валеріанової кислоти (0,60 г, 3,4 ммоль), EDCI (0,60 г, 3,4 ммоль), діізопропілетиламін (0,90 г, 6,7 ммоль) і DMAP (5 мг, каталізатор). Rf 0.5 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 19

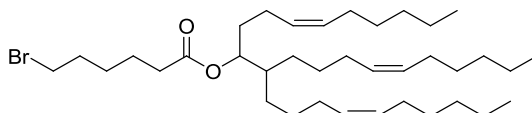
15



[0398] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 6-((диметиламіно)гексаноата 11, (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-іла 5-((диметиламіно)пентаноат 19 одержують у вигляді безбарвного масла (0.2 г, 24%) з 5.6 М диметиламіну в етанолі (10 мл) і (6Z,15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-ола 17 (0.35 г, 0.7 ммоль). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.40-5.28 (м, 6H), 4.97-4.88 (м, 1H), 2.35-2.24 (м, 4H), 2.24-2.19 (м, 6H), 2.08-1.93 (м, 12H), 1.70-1.55 (м, 3H), 1.55-1.45 (м, 5H), 1.45-1.13 (м, 25H), 0.93-0.82 (м, 9H). Rf 0.4 (10% MeOH- CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 20

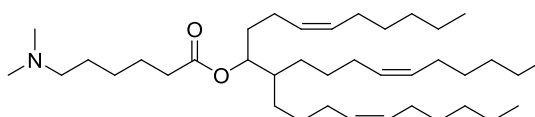
25



[0399] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z,16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 6-бромогексаноата 10, (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-іла 6-бромогексаноат 20 одержують у вигляді безбарвного масла (1.4 г, 99%) з (6Z,15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-ола 17 (0.35 г, 0.7 ммоль), 6-Бromo-н-капронової кислоти (0.70 г, 3.4 ммоль), EDCI (0.60 г, 3.4 ммоль), діізопропілетиламіна (0.90 г, 6.7 ммоль) і DMAP (5 мг, катализатор). Rf 0.6 (10% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 21

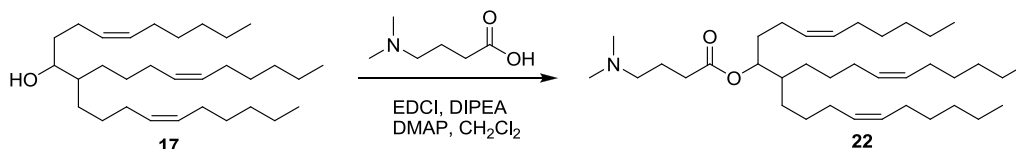
35



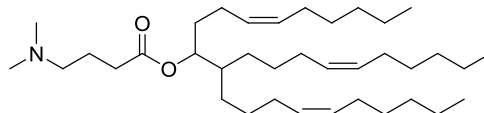
[0400] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іла 6-((диметиламіно)гексаноата 11 (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-іла 6-((диметиламіно)гексаноат 21 одержують у вигляді безбарвного масла (1.2 г, 92%) з 5.6 М диметиламіна в етанолі (15 мл). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.44-5.28 (м, 6H), 4.95-4.88 (м, 1H), 2.33-2.19 (м, 10H), 2.08-1.90 (м, 12H), 1.70-1.23 (м, 9H), 1.23-1.14 (м, 26H), 0.93-0.85 (м, 9H). Rf 0.15 (10% MeOH- CH_2Cl_2).

Схема Синтезу для Сполуки 22

45



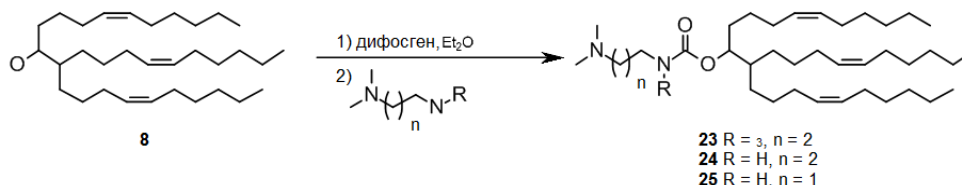
Синтез Сполуки 22



5

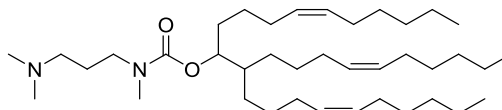
[0401] До розчину (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-ола 17 (0,5 г, 1,1 ммоль), 4-(диметиламіно)бутанової кислоти гідрохлорида (0,3 г, 1,7 ммоль), EDCI гідрохлорида (0,3 г, 1,7 ммоль), додавали DIPEA (0,4 г, 3,4 ммоль) у безводному дихлорметані (10 мл) додавали DMAP (5 мг). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі в атмосфері азоту. Суміш концентрували у вакуумі насухо, потім поміщали у DCM (150 мл) і екстрагували насиченим розчином бікарбонату натрію. Реакційну суміш очищали за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі 60 (1:1 етилацетат/гексани) з одержанням (6Z, 15Z)-11-((Z)-дек4-еніл)-хенікоза 6,15-дієн-10-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 22 у вигляді безбарвного масла (0,4 г, 67%). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5.40-5.28 (м, 6H), 4.97-4.90 (м, 1H), 2.36-2.25 (м, 4H), 2.25-2.19 (м, 6H), 2.07-1.95 (м, 12H), 1.85-1.73 (м, 2H), 1.58-1.45 (м, 3H), 1.45-1.10 (м, 24H), 0.93-0.85 (м, 9H). R_f 0.4 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема Синтезу для Сполук 23, 24 і 25



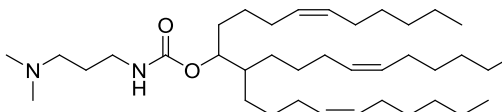
20

Синтез Сполуки 23



[0401] Розчин (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ола 8 (0,5 г, 1,1 ммоль) у безводному діетиловому ефірі (10 мл) повільно додавали до розчину дифосгену (0,2 мл, 1,8 ммоль) у безводному діетиловому ефірі, охолоджували до близько -15°C. Розчин перемішували протягом 1 години, потім N,N,N'-триметил-1,3-пропандіаміна (1.3 мл, 8.7 ммоль) додавали при -15°C. Розчин нагрівали до кімнатної температури, перемішували протягом 1 години, а потім фільтрували, щоб видалити солі амонія і сечовини. Фільтрат діетилового ефіру упарювали у вакуумі насухо. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% етилацетат) із одержанням (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл 3-(диметиламіно)пропіл(метил)карбамата 23 у вигляді безбарвного масла (0,15 г, 23%), ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5.41-5.29 (м, 6H), 4.85-4.77 (м, 1H), 3.35-3.21 (м, 2H), 2.93-2.81 (м, 3H), 2.31-2.17 (м, 8H), 2.08-1.92 (м, 12H), 1.75-1.64 (м, 2H), 1.64-1.15 (м, 31H), 0.92-0.85 (м, 9H). R_f 0.45 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

Синтез Сполуки 24



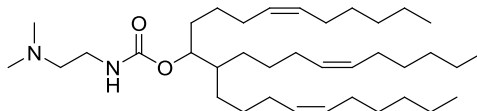
40

[0403] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 3-(диметиламіно)пропіл(метил)карбамата 23, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 3-(диметиламіно)пропілкарбамат 24 одержували у вигляді безбарвного масла

(0,1 г, 17%) з (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-олу 8 (0,5 г, 1,1 ммоль), дифосгена (0,2 мл, 1,8 ммоль), піридина, і 3-(диметиламіно)-1-пропіламіна (0,9 г, 8,7 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,44-5,28 (м, 6H), 4,81-4,72 (бс, 1H), 4,55-4,45 (бс, 1H), 3,34-3,15 (м, 3H), 2,45-2,13 (м, 7H), 2,10-1,86 (м, 12H), 1,75-1,57 (м, 3H), 1,57-1,03 (м, 30H), 0,93-0,85 (м, 9H). R_f 0,2 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

5

Синтез Сполуки 25

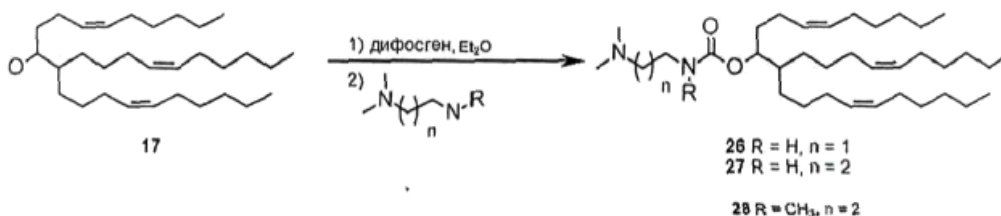


10

[0404] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 3-(диметиламіно)пропіл(метил)карбамата 23, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 2-(диметиламіно)пропілкарбамат 25 одержували у вигляді безбарвного масла (0,20 г, 33%) з (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ола 8 (0,5 г, 1,1 ммоль), дифосгена (0,2 мл, 1,8 ммоль) і N,N-диметилетилєндіаміна (0,8 г, 8,7 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,40-5,28 (м, 6H), 5,08-5,01 (бс, 1H), 4,82-4,73 (бс, 1H), 3,30-3,18 (м, 2H), 2,44-2,35 (м, 2H), 2,30-2,20 (м, 6H), 2,07-1,91 (м, 12H), 1,65-1,11 (м, 31H), 0,93-0,85 (м, 9H). R_f 0,4 (10% MeOH-DCM).

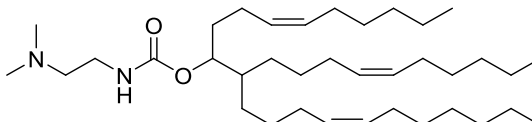
15

Схема Синтезу для Сполук 26, 27 і 28



20

Синтез Сполуки 26



25

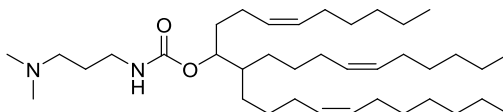
[0405] Розчин (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-докоса 6,15-дієн-10-ола 17 (2,25 г, 5,036 ммоль) і піридину (611 мкл, 7,6 ммоль) в безводному етилацетаті (15 мл) додавали до охолодженого (0°C) розчину дифосгену (910 мкл, 7,6 ммоль) в етилацетаті (15 мл). Після перемішування (10 хв) реакційну суміш фільтрували і концентрували для того, щоб видалити розчинник і газ фосген, що залишився. Третину цієї хлормурашиної кислоти (0,879 г, 1,679 ммоль) розчиняли в етилацетаті (5 мл) і додавали до охолодженого (0°C) розчину з N,N-диметилетилєндіаміна (367 мкл, 3,4 ммоль) в безводному етилацетаті (5 мл). Після перемішування (20 хвилин), суміш фільтрували, концентрували і піддавали хроматографії (100% етилацетат) із одержанням (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-6-докоса-15-дієн-10-іл (2-(диметиламіно)етил)карбамінової кислоти 26 (603 мг, 64%) у вигляді прозорого безбарвного масла. R_f 0,28 (10% MeOH/CH₂Cl₂); ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ_H) 5,45-5,36 (м, 6H), 5,30 (с, 1H), 4,89-4,78 (м, 1H), 3,32-3,21 (м, 2H), 2,42 (т, 2H), 2,25 (с, 6H), 2,16-1,94 (м, 12H), 1,63-1,19 (м, 29H), 0,92 (т, 9H).

30

35

Синтез Сполуки 27

40

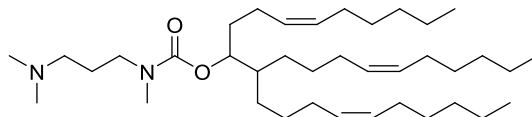


[0406] Охолоджений (0°C) розчин ефіру хлормурашиної кислоти (0,88 г, 1,7 ммоль) (одержаний в синтезі (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-докоса-6,15-дієн-10-іл (2-(диметиламіно)етил)карбамінової кислоти 26) розчиняли в безводному етилацетаті (5 мл) і додавали до розчину в N,N-диметилетилєндіаміні (422 мкл, 3,4 ммоль) у безводному

45

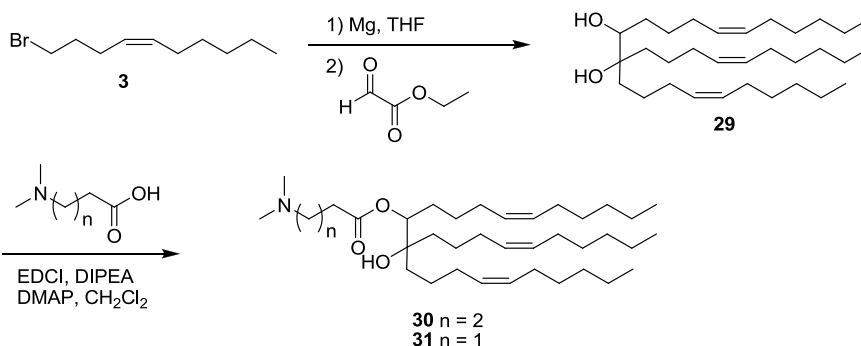
етилацетаті (5 мл). Після закінчення (20 хв), розчин фільтрували, концентрували і неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% етилацетат) із одержанням (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-докоса 6,15-дієн-10-іл (3-(диметиламіно)пропіл)карбамінової кислоти 27 (675 мг, 70%) у вигляді прозорого безбарвного масла. R_f 0,32 (10% MeOH/CH₂Cl₂); ¹H ЯМР (400МГц, CDCl₃, δ_H) 5,44-5,33 (м, 6H), 4,86-4,78 (м, 1H), 3,32-3,21 (м, 2H), 2,36 (т, 2H), 2,24 (с, 6H), 2,14-1,97 (м, 12H), 1,69 (додаток. п, 2H), 1,61-1,50 (м, 3H), 1,50-1,20 (м, 27H), 0,91 (т, 9H).

Синтез Сполуки 28

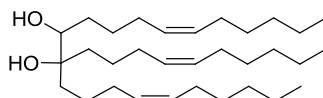


[0407] Охолоджений (0°C) розчин ефіру хлормурашиної кислоти (0,88 г, 1,7 ммоль) (одержаний в синтезі (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-докоса-6,15-дієн-10-іл (2-(диметиламіно)етил)карбамінової кислоти 26) розчиняли в безводному етилацетаті (5 мл) і додавали до розчину N,N,N'-диметилетилєндіаміна (492 мкл, 3,4 ммоль) у безводному етилацетаті (5 мл). Після закінчення (20 хв.), розчин фільтрували, концентрували і неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% етилацетат) із одержанням (6Z, 15Z)-11-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-хенікоза-6,15-дієн-10-іл (3-(диметиламіно)пропіл)(метил)карбамата 28 (672 мг, 68%) у вигляді прозорого безбарвного масла. R_f 0,44 (10% MeOH/CH₂Cl₂); ¹H ЯМР (400МГц, CDCl₃, δ_H) 5,43-5,32 (м, 6H), 4,85 (шир. с, 1H), 3,38-3,27 (м, 2H), 2,95-2,87 (м, 3H), 2,28 (т, 2H), 2,24 (с, 6H), 2,14-1,96 (м, 12H), 1,72 (додаток. п, 2H), 1,67-1,49 (м, 3H), 1,49-1,20 (м, 26H), 0,91 (т, 9H).

Схема Синтезу для Сполук 30 і 31

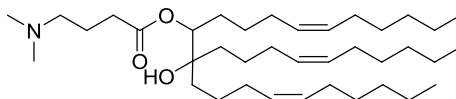


Синтез Сполуки 29



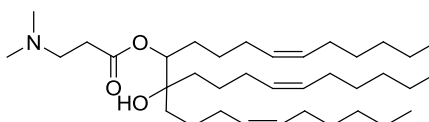
[0404] У 100-мл круглодонну колбу додавали магнієву стружку (263 мг, 10,9 ммоль) і магнітну мішалку. Колбу висушували з використанням фену протягом 5 хв., охолоджували в атмосфері азоту до THF (5 мл) і додавали невелике зерно йоду. Був доданий розчин (Z)-1-бромдец-4-ену 3 (2 г, 9,1 ммоль) у THF (5 мл). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім додавали етиловий гліоксалат (0,375 мл, 1,82 ммоль, 50% розчин у толуолі). Після закінчення розчин гасили насиченим розчином хлориду амонію (5 мл) і перемішували до того часу, поки не розчинився надлишок магнію. Розчин розбавляли водою і екстрагували етилацетатом (3x50 мл). Об'єднані екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії (100% гексани до 20% етилацетату в гексанах) із одержанням (6Z, 16Z)-11-((Z)-дец-4-еніл) докоса-6,16-дієн-11,12 діола 29 у вигляді безбарвного масла (700 мг, 48%).

Синтез Сполуки 30



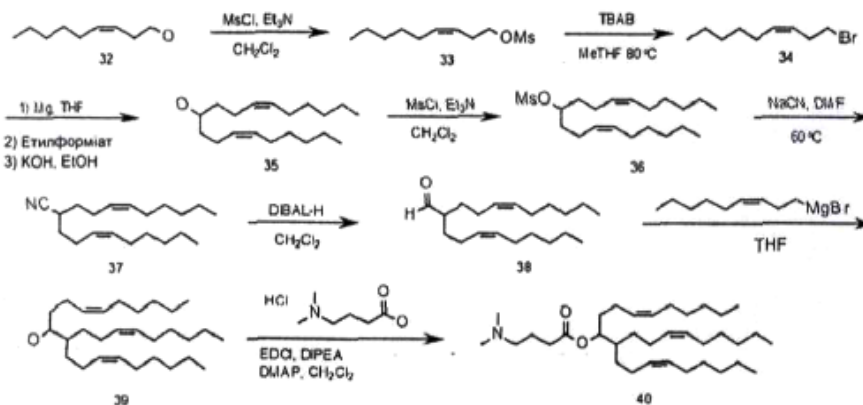
[0409] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса-6,16-дієн-11-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 9, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-12-гідроксидокоса-6,16-дієн-11-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 30 одержували у вигляді безбарвного масла (0,10 г, 25%) з (6Z, 16Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11,12-діола (0,35 г, 0,7 ммоль), 4-(диметиламіно)бутанової кислоти гідрохлорида (0,20 г, 1,1 ммоль), EDCI (0,20 г, 1,1 ммоль), діізопропілетиламіна (0,3 г, 2,2 ммоль) і DMAP (5 мг, каталізатор). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,44-5,28 (м, 6H), 5,03-4,95 (м, 1H), 2,25-2,17 (м, 6H), 2,14-1,65 (м, 14H), 1,65-1,10 (м, 33H), 0,93-0,82 (м, 9H). Rf 0,2 (10% MeOH- CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 31

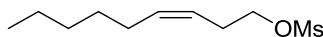


[0410] Відповідно до процедури, описаної для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл) докоса-6,16-дієн-11-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 9, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл) -12-гідроксидокоса-6,16-дієн-11-іл 3-(диметиламіно) пропаноат 31 одержували у вигляді безбарвного масла (0,4 г, 33%) з (6Z, 16Z)-11-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11,12-діола (1,0 г, 2,1 ммоль), 4-(диметиламіно)бутанової кислоти гідрохлорида (0,50 г, 3,1 ммоль), EDCI (0,60 г, 3,1 ммоль), діізопропілетиламіна (0,80 г, 6,3 ммоль) і DMAP (5 мг, каталізатор). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,40-5,28 (м, 6H), 5,12-5,07 (м, 1H), 4,75-4,55 (шс, 1H), 2,77-2,65 (м, 1H), 2,65-2,41 (м, 3H), 2,28-2,15 (м, 6H), 2,15-1,92 (м, 12H), 1,67-1,10 (м, 30H), 0,93-0,82 (м, 9H). Rf 0,5 (10% MeOH- CH_2Cl_2).

Схема Синтезу для Сполуки 40

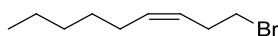


Синтез Сполуки 33



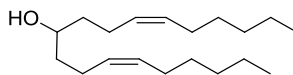
[0411] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 2, (Z)-нон-3-еніл метансульфонат 33 одержували у вигляді масла жовтого кольору (33 г, 85%) з (Z)-нон-3-ен 1-ола 32 (25,0 г, 176 ммоль), триетиламіну (25,0 мл) і метансульфонілхлориду (27,2 мл, 352 ммоль). Rf 0,68 (CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 34



[0412] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 3, (Z)-нон-3-еніл броміду 34 одержували у вигляді жовтого масла (20,2 г, 85%) з (Z)-нон-3-еніл метансульфоната (25,7 г, 117 ммоль) і бромід тетрабутиламонію (52,6 г, 163 ммоль). Rf 0,73 (гексани).

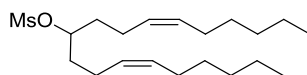
Синтез Сполуки 35



5 [0413] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 4, (6Z, 13Z)-нондека-6,13-дієн-10-ол 35 (9,11 г, 85%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-нон-3-еніл броміду (15,8 г, 76,8 ммоль), магнієвої стружки (2,0 г, 82 ммоль), етилформіату (6,36 мл, 79,1 ммоль) і гідроксиду калію (3,88 г, 69,1 ммоль). Rf 0,43 (10% етилацетат-гексани).

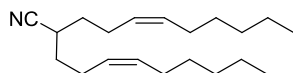
Синтез Сполуки 36

10



15 [0414] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 5, (6Z, 13Z)-нондека-6,13-дієн-10-іл метансульфоната 36 (11,6 г, 99%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 13Z)-нондека-6,13-дієн-10-ола (9,11 г, 32,5 ммоль), триетиламіна (10 мл) і метансульфонілхлорида (5,0 мл, 65 ммоль). Rf 0,73 (CH₂Cl₂).

Синтез Сполуки 37

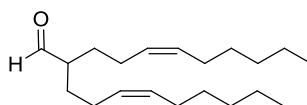


20

[0415] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 6, (Z)-2-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ундец-5-еннітрила 37 (7,2 г, 77%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 13Z)-нондека-6,13-дієн-10-іл метансульфоната (11,6 г, 32,3 ммоль) і ціаніду натрію (3,96 г, 80,9 ммоль). Rf 0,75 (10% етилацетат-гексани).

25

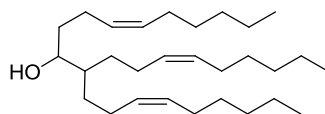
Синтез Сполуки 38



30

[0416] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 7, (Z)-2-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ундец-5-аль 38 (5,0 г, 69%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-2-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ундец-5-еннітрила (7,2 г, 24,9 ммоль) і DIBAL (49,7 мл, як 1 М розчин у гексанах, 49,7 ммоль). Rf 0,69 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 39

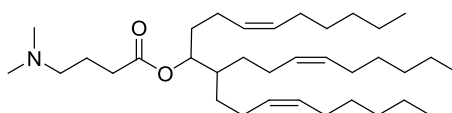


35

[0417] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 8, (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)-ікоса-6,14-дієн-10-ол 39 (1,64 г, 76%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-2-((Z)-нон-3-ен-1-іл)-ундец-5-ола (1,5 г, 5,1 ммоль), (Z)-нон-3-еніл бромід (1,58 г, 7,7 ммоль) і магнієвої стружки (206 мг, 8,5 ммоль). Rf 0,46 (10% етилацетат-гексани).

40

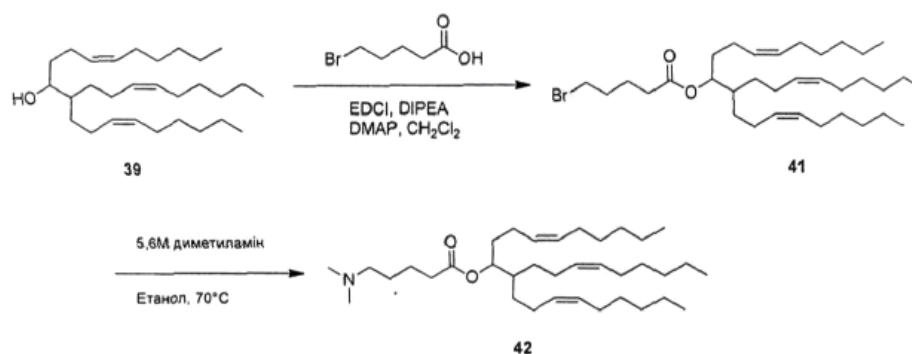
Синтез Сполуки 40



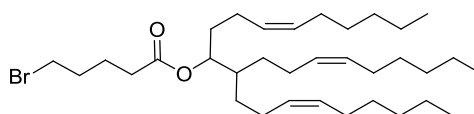
45

[0418] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 9, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-іл 4-(диметиламіно)бутанової кислоти 40 (483 мг, 76%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)-ікоса-6,14-дієн-10-ола (500 мг, 1,19 ммоль), EDC (686 мг, 3,58 ммоль), основи Хюніга (726 мкл, 4,17 ммоль) і гідрохлорида N,N-диметиламінобутирової кислоти (600 мг, 3,58 ммоль). Rf 0,43 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

Схема Синтеза для Сполуки 42



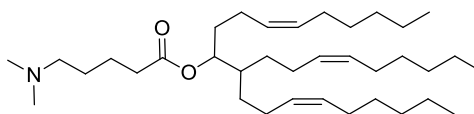
5 Синтез Сполуки 41



10 [0419] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 10, (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ікоза-6,14-дієн-10-іл 5-бромопентаноата 41 (655 мг, 95%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ікоза-6,14-дієн-10-ола (500 мг, 1,19 ммоль), EDC (686 мг, 3,58 ммоль) і 5-бромвалеріанової кислоти (649 мг, 3,58 ммоль). Rf 0,54 (5% етилацетат-гексани).

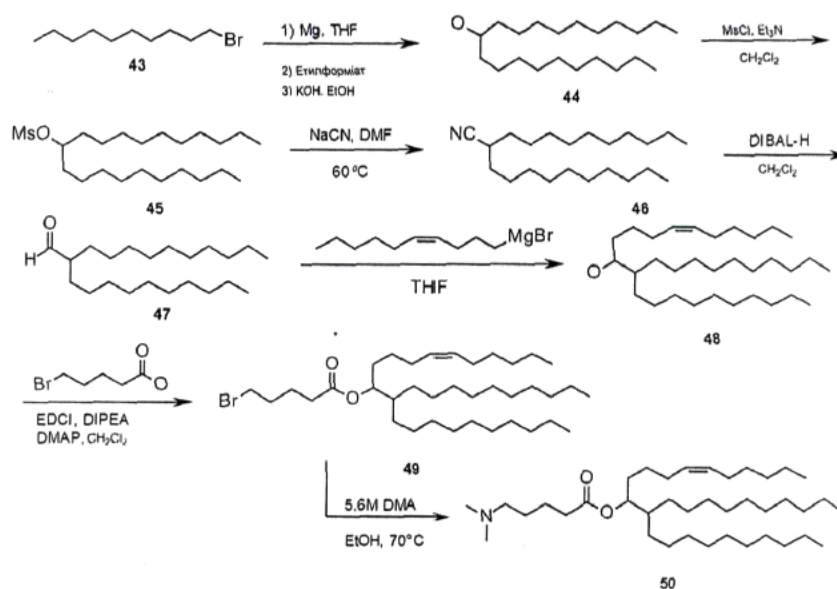
Синтез Сполуки 42

15



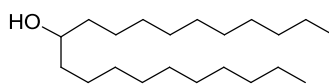
20 [0420] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 11, (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ікоза-6,14-дієн-10-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 42 (421 мг, 68%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 14Z)-11-((Z)-нон-3-ен-1-іл)ікоза-6,14-дієн-10-іл-5 бромопентаноата (655 мг, 1,13 ммоль) і диметиламіну (25 мл у вигляді розчину в 5,6 М EtOH). Rf 0.4 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

Схема Синтезу для Сполуки 50



25

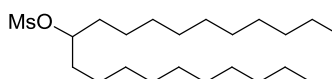
Синтез Сполуки 44



5 [0421] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 4, хенікозан-11-ол 44 (7,06 г, 99%) одержували у вигляді безбарвного масла з бромдекана (9,4 мл, 45,2 ммоль), магнієвої стружки (1,18 г, 48,4 ммоль), етилформіата (3,74 мл, 46,6 ммоль) і гідроксида калію (2,28 г, 40,7 ммоль). Rf 0,36 (10% етилацетат-гексан), FW 312.57, C₂₁H₄₄O.

Синтез Сполуки 45

10

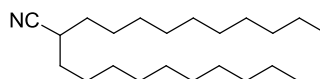


15

[0422] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 5, хенікозан-11-ілметансульфонат 45 (6,87 г, 78%) одержували у вигляді безбарвного масла з хенікозан-11-ола (7,06 г, 22,6 ммоль), триетиламіну (22 мл) і метансульфонілхлориду (3,5 мл, 45 ммоль). Rf 0.86 (CH₂Cl₂).

Синтез Сполуки 46

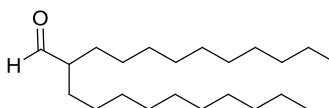
20



[0423] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 6, 2-децилдодеканенітрил 46 (2,25 г, 40%) одержували у вигляді безбарвного масла з хенікозан-11-іл метансульфоната (6,87 г, 17,6 ммоль) і ціаніду натрію (4,31 г, 87,9 ммоль). Rf 0,84 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 47

25

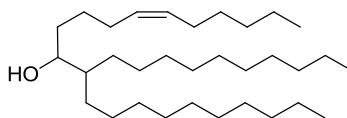


30

[0424] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 7, 2-децилдодеканал 47 (1,91 г, 84%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2-децилдодеканенітрила (2,25 г, 7,0 ммоль) і DIBAL (14 мл, у вигляді розчину 1 М в гексанах, 14 ммоль). Rf 0,51 (5% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 48

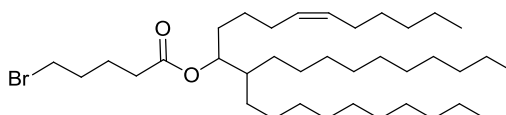
35



40

[0425] Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 8, (Z)-12-децилдодекос-6-ен-11-ол 48 (1,08 г, 40%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2-децилдодеканала (1,91 г, 5,87 ммоль), (Z)-дец-4-еніл броміда (1,45 г, 7,05 ммоль) і магнієвих стружок (183 мг, 7,54 ммоль). Rf 0,26 (10% етилацетат-гексани).

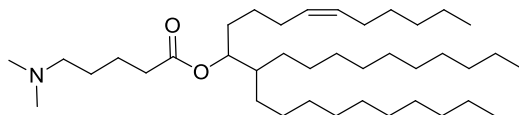
Синтез Сполуки 49



45

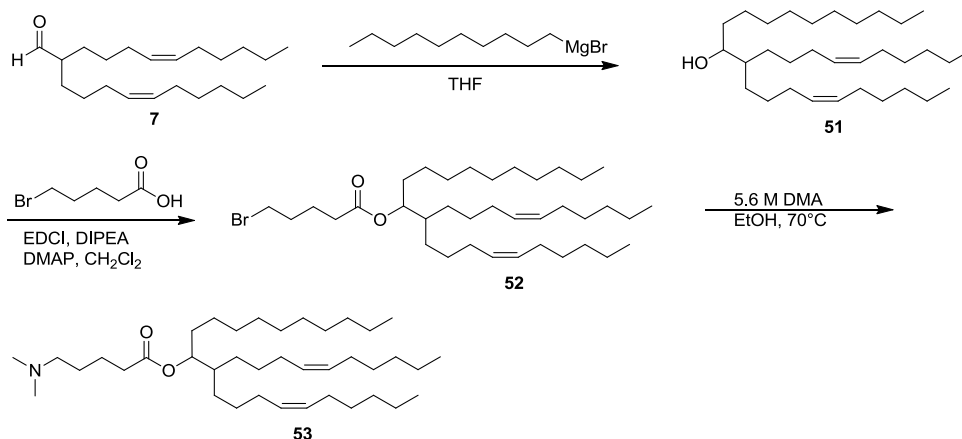
[0426] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 10, (Z)-12-децилдодекос-6-ен-11-іл-5-бромопентаноат 49 (916 мг, 63%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-12-децилдодекос-6-ен-11-олу (1,08 г, 2,33 ммоль), EDC (804 мг, 4,19 ммоль) і 5-бромвалеріанової кислоти (1,27 г, 6,99 ммоль). Rf 0,29 (5% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 50

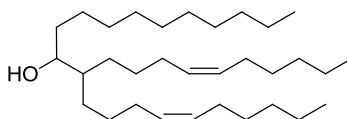


[0427] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 11, (Z)-12-децилдокос-6-ен-11-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 50 (662 мг, 80%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-12-децилдокос-6-ен-11-іл-5 бромопентаноата (916 мг, 1.16 ммоль) і диметиламіну (27 мл у вигляді розчину 5,6 М EtOH). Rf 0.51 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

Схема Синтеза для Сполуки 53

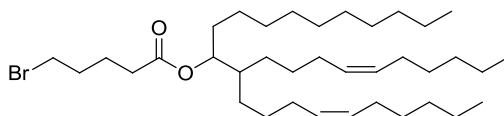


Синтез Сполуки 51



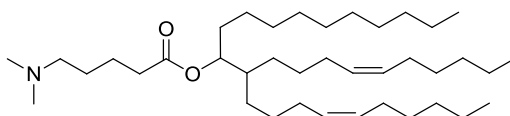
[0428] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 8, (Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл) докос-16-ен-11-ол 51 (3,37 г, 65%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-аля 7 (3,6 г, 11.2 ммоль), 1-бромдекана (3,5 мл, 16,9 ммоль) і магнієвої стружки (438 мг, 18,0 ммоль). Rf 0,31 (5% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 52



[0429] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 10, (Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл) докос-16-ен-11-іл-5 бромопентаноат 52 (4,69 г, 99%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-12-((Z)-дек4-ен-1-іл)докос-16-ен-11-ола (3,37 г, 7,29 ммоль), EDC (2,51 г, 13.1 ммоль) і 5-бромвалеріанової кислоти (3,96 г, 21,8 ммоль). Rf 0,56 (5% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 53



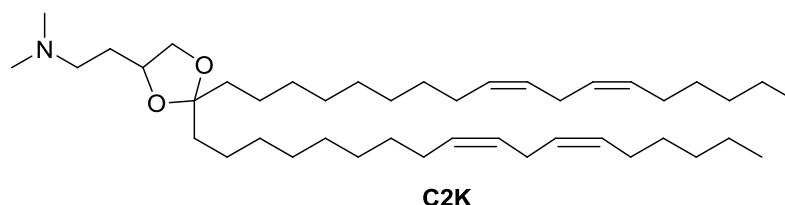
[0430] Відповідно до процедури, описаної для синтезу 11, (Z)-12-децилдокос-6-ен-11-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 53 (943 мг, 99%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-12-децилдокос-6-ен-11-іл-5 бромопентаноата (1,0 г, 1,6 ммоль) і диметиламіну (30 мл у вигляді розчину 5,6 М EtOH). Rf 0.50 (10% CH₃OH-CH₂Cl₂).

Приклад 2

[0431] Цей Приклад порівнює ефективність у мишачій моделі активності АроВ міРНК, триалкіламін ліпідів коротких ланцюгів за цим винаходом з ліпідами, що мають довші алкільні ланцюги, але які інакше є конструктивно ідентичними з коротким ланцюгом триалкіламін ліпідів.

[0432] Композиції нуклеїнових кислот-ліпідних часток, що містять катіонні ліпіди, оцінювали по їх здатності зупиняти експресію АроВ у печінці від 7 до 9-тижневих самок BALB/c мишей. Мишам вводили внутрішньовенно (у хвостову вену) у групах по три на кожну 0,02, 0,03 або 0,05 мг/кг. Зупинка АроВ (нормалізований конститутивний ген GAPDH) була виміряна по відношенню до PBS як негативний контроль. Кожен експеримент був припинений через 48

годин після прийому препарату. [0433] Для порівняння з позитивним контролем, продуктивність короткого ланцюга триалкіламін ліпідів за цим винаходом порівнювали з висококатіонним ліпідом, що називається C2K, який, як відомо, полегшує доставку нуклеїнових кислот in vivo в нуклеїнові кислот-ліпідні частки (Nature Biotech., Vol. 28(2), 172 (2010)). C2K має наступну структуру:



[0434] Як показано в Таблиці 1, при введенні дози від 0,02 мг/кг, 10 з 11 катіонних ліпідів за цим винаходом (сполуки 9, 13, 14, 19, 22, 27, 40, 42, 50 і 53) відображають більшу активність, ніж C2K.

Таблиця 1

Сайленсинг АРОВ (0.02 мг/кг міРНК) для різних триалкіл катіонних ліпідів за цим винаходом

Доза міРНК	Сполука	Сайленсинг АРОВ гена, схожого з PBS контролем (Печінка АроВ:GAPD мРНК співвідношення)
0,02 мг/кг	C2K	-61%
	9	-73%
	13	-80%
	14	-69%
	19	-79%
	22	-79%
	24	-48%
	27	-68%
	40	-80%
	42	-77%
	50	-72%
	53	-78%

[0435] Як показано в Таблиці 2, в окремому експерименті, при введенні дози 0,03 мг/кг, 5 з 7 катіонних ліпідів за цим винаходом (сполуки 11, 13, 19, 23, і 25) відображають більшу активність, ніж C2K.

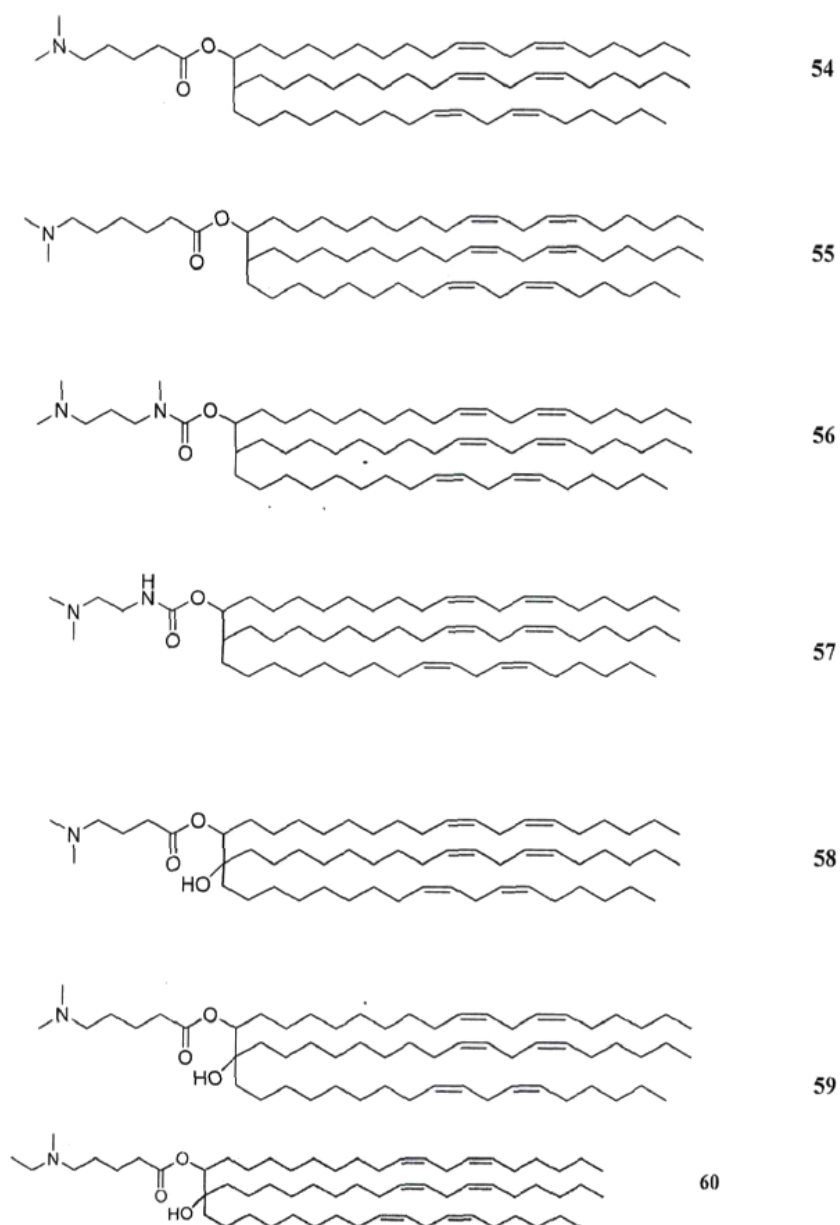
Таблиця 2

Сайленсинг АРОВ (0.03 мг/кг мiPHK для різних коротких ланцюгів триалкіл катіонних ліпідів

Доза мiPHK	Сполука	Сайленсинг АроВ гена, схожого з PBS контролем (Печінка АроВ:GAPD мPHK співвідношення)
0,03 мг/кг	C2K	-54%
	9	-49%
	11	-78%
	13	-84%
	19	-87%
	23	-80%
	25	-63%
	30	-30%

5 [0436] Активність катіонних ліпідів за цим винаходом також порівнювали з відповідними триалкілзаміщеними катіонними ліпідами, які структурно ідентичні ліпідам за цим винаходом, за винятком того, що алкільні ланцюги довше. Структури цих подовжених ланцюгів триалкіламін катіонних ліпідів (визначені як сполуки 54, 55, 56, 57, 58, 59 і 60) наведені у Таблиці 3.

Таблиця 3: Структура довгого ланцюга триалкіл катіонних ліпідів



Сполуки 54, 55, 56, 57, 58, 59 і 60 були отримані відповідно до процедур, описаних у заявці на патент США № 13/235253, поданої 16 вересня 2011, яка включена у цей опис шляхом посилання у повному обсязі.

[0437] Як показано у Таблиці 4, довші ланцюги ліпідів 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 вводили в кількості 0,05 мг/кг (2,5 рази дозу, описану в Таблиці 1), і відображається АроВ нокдаун, охоплюючи від + 25% до -69% у порівнянні з 60% у C2K (тобто, деякі сполуки відображують помірне покращення у порівнянні з C2K).

Таблиця 4

Сайленсинг АроВ (0.05 мг/кг мІРНК) для різних трилінолеїл катіонних ліпідів

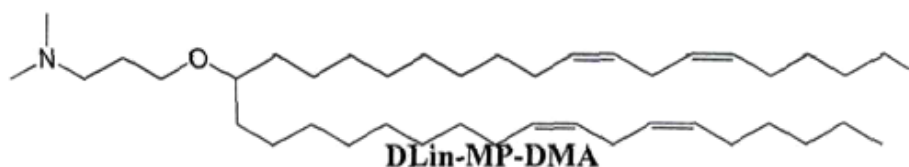
Доза мІРНК	Сполука	Сайленсинг АроВ гена, схожого з PBS контролем (Печінка АроВ:GAPD мРНК співвідношення)
0,05 мг/кг	C2K	-60% ^a
	54	-6%
	55	-28%
	56	-23%
	57	+25%
	58	-62%
	59	-69%
	60	-63%

^a Середній сайленсинг АроВ за чотирма дослідженнями

[0438] У цілому, активність коротшого ланцюга (C9-C10) триалкіл катіонних ліпідів за цим винаходом була істотно покращена у порівнянні з відповідним довгим ланцюгом, трилінолеїл (C18) відповідного ліпиду. Наприклад, безпосереднє порівняння сполуки 13 з її трилінолеїл варіантом 54 показало, що удосконалення від -6% (0,05 мг/кг) до -80% (0,02 мг/кг) у АроВ нокдауні, не дивлячись на те, що сполуку 13 вводили у 2,5 рази менше. Та ж тенденція спостерігається при порівнянні сполук від 55 до 11, від 56 до 24 і від 57 до 25.

Приклад 3

[0439] Додаткові експерименти в мишачій моделі АроВ використовували інший катіонний ліпід як позитивний контроль; DLIN-MP-DMA. DLIN-MP-DMA описаний у заявці на патент WO 2011/141705, і має структуру:



[0440] Як показано в Таблиці 5, у тій самій мишачій моделі АроВ, було показано, що DLIN-MP-DMA ефективніший, ніж C2K, у трьох окремих експериментах, і, отже, вибраний позитивним контролем:

Таблиця 5

Порівняння між C2K і DLIN-MP-DMA як Позитивним Контролем

	Доза мІРНК	Сполука	Сайленсинг АроВ гена, схожого з PBS контролем (Печінка АроВ:GAPD мРНК співвідношення)
Експеримент 1	0,03 мг/кг	C2K	-51%
		DLin-MP-DMA	-69%
Експеримент 2	0,05 мг/кг	C2K	-59%
		DLin-MP-DMA	-65%
Експеримент 3	0,03 мг/кг	C2K	-54%
		DLin-MP-DMA	-62%

[0441] В іншому експерименті, ще два ліпіди за цим винаходом (сполуки 62 і 71) були поміщені в ліпідні наночастки з мІРНК для ураження АроВ. Мишам вводили дози внутрішньовенно (у хвостову вену) і вбивали через 48 год після прийому препарату. Печінку збирали і гомогенізували, а рівень виключення АроВ (нормалізований конститутивний ген GAPDH), вимірювали за допомогою Quantigene Assay. Результати показані в Таблиці 6 і

виражені у вигляді відсотка по відношенню до PBS-обробленому негативному контролю. МіРНК послідовності, що використовувались у цьому експерименті, були відмінними і менш потужними, ніж використані у Прикладі 2. Порівняння між експериментами тому не є можливим:

Таблиця 6

АроВ сайленсинг для різних триалкілкатіонних ліпідів згідно цьому винаходу

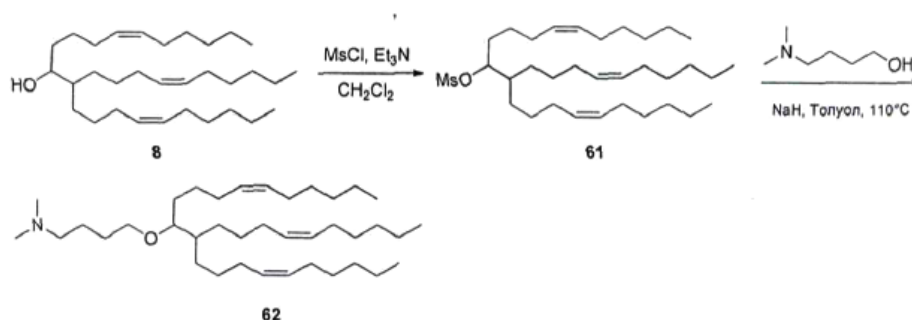
Доза міРНК	Сполука	Сайленсинг АроВ гена, схожого з PBS контролем (Печінка АроВ:GAPD мРНК співвідношення)
0,04 мг/кг	DLin-MP-DMA	-32%
	Сполука 62	-56%
	Сполука 71	-29%

[0442] Сполука 71 мала схожу активність з контролем DLIN-MP-DMA. Сполука 62 була значно активнішою. Синтез цих і інших сполук описаний у прикладі 4.

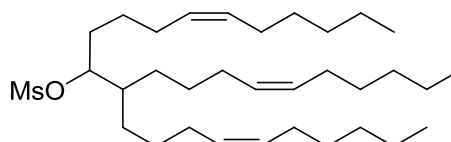
Приклад 4

Цей Приклад описує синтез додаткових сполук цього винаходу.

Схема синтезу для Сполуки 62

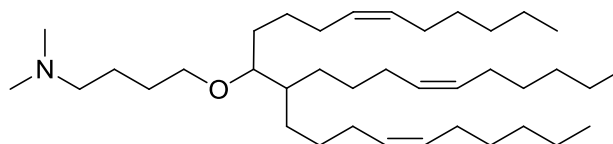


Синтез Сполуки 61



Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 5, (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-іл метансульфонат 61 (1,18 г, 90%) одержували у вигляді безбарвного масла з (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-ола 8 (1,12 г, 2.43 ммоль), триетиламіну (8 мл), і метансульфонілхлорида (0,38 мл, 4,9 ммоль). Rf 0.91 (CH₂Cl₂).

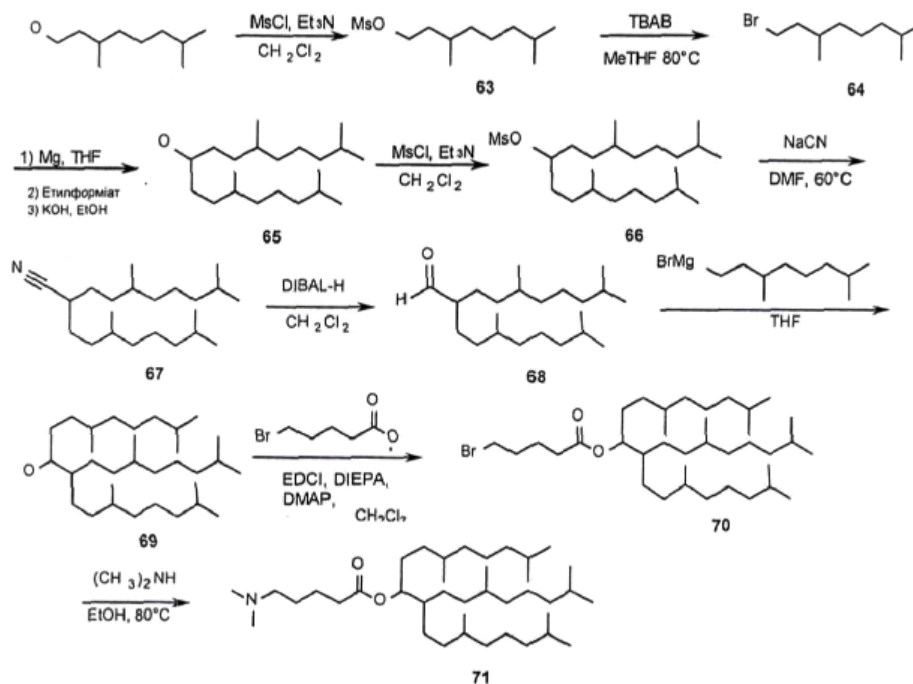
Синтез Сполуки 62



Розчин мезилата 61 (1,09 г, 2.01 ммоль) у толуолі (30 мл) послідовно обробляли N,N-диметиламінобутанолом (1,34 мл, 10.1 ммоль) і NaH (442 мг у вигляді 60% дисперсії в маслі, 11,1 ммоль). Після припинення виділення газу реакційну суміш нагрівали із зворотним холодильником (115°C темп. ванни) і перемішували (50 годин). Реакційну суміш потім охолоджували (RT) і виливали в холодну воду, і потім екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні шари промивали водою і сольовим розчином, сушили (Na₂SO₄), фільтрували, концентрували і очищали за допомогою хроматографії (100% етилацетат) із одержанням 4-(((6Z, 16Z)-12-((Z)-4-дек ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-іл)окси)-N,N-диметилбутан-1-аміна 62 (143 мг, 13%) у вигляді блідо-жовтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 5,41-5,30 (м, 6H), 3,46-3,35

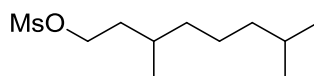
(м, 2H), 3,19-3,14 (м, 1H), 2,34 (т, 2H), 2,24 (с, 6H), 2,10-1,93 (м, 12H), 1,60-1,09 (м, 35H), 0,90 (т, 9H). Rf 0,54 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема синтезу для Сполуки 71



5

Синтез Сполуки 63

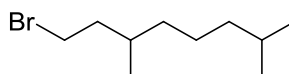


10

Відповідно до процедури, описаної для синтезу 5, 3,7-диметилоктил метансульфонат 63 (7,47 г, >99%) одержували у вигляді безбарвного масла з 3,7-диметилоктан-1-ола (5,0 г, 31,6 ммоль), триетиламіну (8 мл) і метансульфонілхлорида (4,89 мл, 63,2 ммоль). Rf 0,69 (CH₂Cl₂).

Синтез Сполуки 64

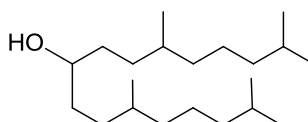
15



20

Відповідно до процедури, описаної для синтезу 3, 1-бром-3,7-диметилоктан 64 одержували у вигляді безбарвного масла (6,0 г, 86%) з 3,7-Диметилоктил метансульфоната 63 (7,47 г, 31,6 ммоль) і тетрабутиламоній броміду (13,2 г, 41,1 ммоль). Rf 0,92 (гексани).

Синтез Сполуки 65

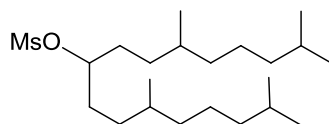


25

Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 4, 2,6,12,16-тетраметилгептадекан-9-ол 65 (7,0 г, вихід кількісний) одержували у вигляді безбарвного масла з 1-бром-3,7-диметилоктана 64 (10 г, 45,2 ммоль), магнієвих стружок (1,21 г, 49,8 ммоль), етилформиату (3,8 мл, 47,5 ммоль) і гідроксида калію (3,8 г, 67,8 ммоль). Rf 0,38 (10% етилацетат-гексани).

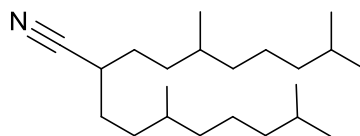
30

Синтез Сполуки 66



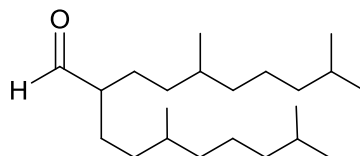
Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 5, 2,6,12,16-тетраметилгептадекан-9-іл метансульфонат 66 (1,56 г, 87%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2,6,12,16-тетраметилгептадекан-9-ола 65 (1,39 г, 5,14 ммоль), триетиламіна (3 мл) і метансульфонілхлорида (0,8 мл, 10,3 ммоль). R_f 0,8 (CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 67



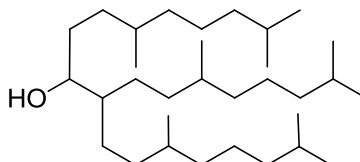
Відповідно до процедури, описаної для синтезу 6, 2-(3,7-диметилоктил)-5,9-диметилдеканенітрил 67 (0,8 г, 56%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2,6,12,16-тетраметилгептадекан-9-іл метансульфоната 66 (1,56 г, 4,48 ммоль) і ціаніда натрію (0,55 г, 11,2 ммоль). R_f 0,8 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 68



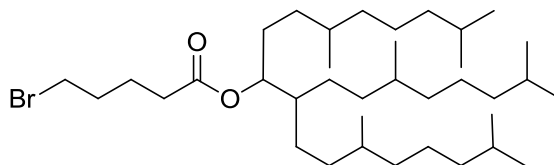
Відповідно до процедури, описаної для синтезу 7, 2-(3,7-диметилоктил)-5,9-диметилдеканал 68 (0,63 г, 78%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2-(3,7-диметилоктил)-5,9-диметилдеканенітрила 67 (0,8 г, 2,49 ммоль) і DIBAL (5,74 мл вигляді 1М розчину у гексанах, 5,74 ммоль). R_f 0,6 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 69



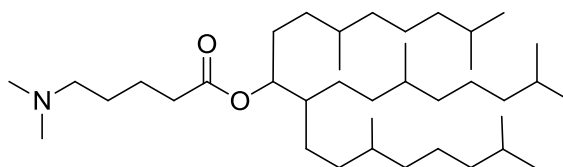
Відповідно до процедури, описаної для синтезу 8, 10-(3,7-диметилоктил)-2,6,13,17-тетраметилгептадекан-9-ол 69 (0,53 г, 62%) одержували у вигляді безбарвного масла з 2-(3,7-диметилоктил)-5,9-диметилдеканала 68 (0,6 г, 1,85 ммоль), 1-бром-3,7-диметилгексана 64 (2,0 г, 9,0 ммоль) і магнієвої стружки (232 мг, 9,67 ммоль). R_f 0,37 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 70



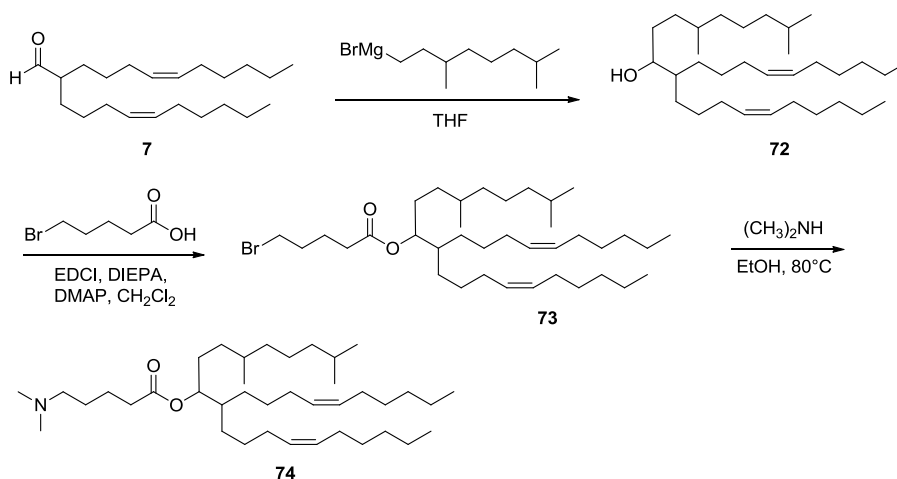
Відповідно до процедури, описаної для синтезу 10, 10-(3,7-диметилоктил)-2,6,13,17-тетраметилгептадекан-9-іл-5 бромопентаноат 68 (450 мг, неочищений) одержували у вигляді жовтого масла з 10-(3,7-диметилоктил)-2,6,13,17-тетраметилгептадекан-9-ола 69 (200 мг, 0,43 ммоль), EDC (246 мг, 1,28 ммоль) і 5-бромвалеріанової кислоти (246 мг, 1,28 ммоль). R_f 0,49 (5% EtOAc-гексани).

Синтез Сполуки 71

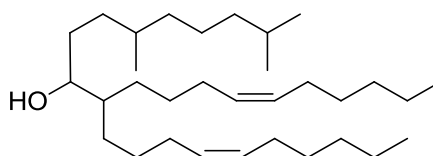


Відповідно до процедури, описаної для синтезу 11, 10-(3,7-диметилоктил)-2,6,13,17-тетраметилоктадекан-9-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 71 (184 мг, 72% 2 кроків) одержували у вигляді безбарвного масла з 10-(3,7-диметилоктил)-2,6,13,17-тетраметилоктадекан-9-іл-5 бромопентаноата 68 (450 мг, сирого) і диметиламіну (10 мл 2,0 М як розчин EtOH). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4.95-4.87 (м, 1H), 2.33 (т, 2H), 2.28 (т, 2H), 2.23 (с, 6H), 1.74-1.60 (м, 4H), 1.58-0.99 (м, 37H), 0.93-0.79 (м, 27H). Rf 0.43 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Схема синтезу для Сполуки 74

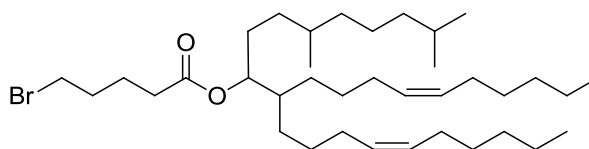


Синтез Сполуки 72



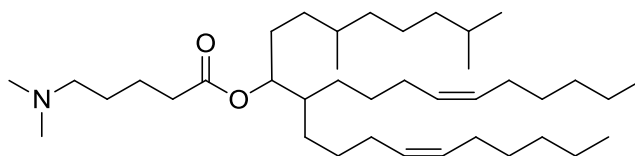
Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 8, (Z)-10-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-2,6-диметилікоз-14-ен-9-ол 72 (0,62 г, 72%) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-аля 7 (0,6 г, 1,87 ммоль), 1-бром-3,7-диметилоктана 64 (3,9 г, 17,5 ммоль) і магнієвої стружки (454 мг, 18,7 ммоль). Rf 0,61 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 73



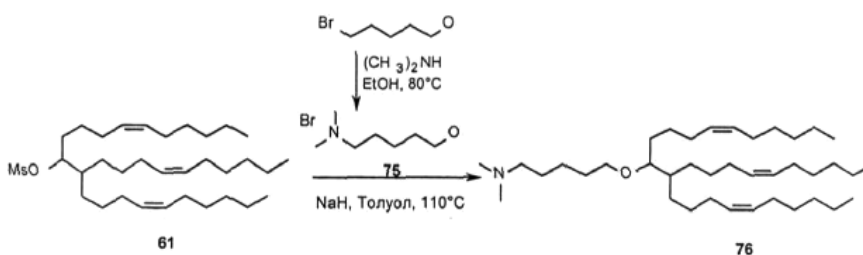
Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 10, (Z)-10-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-2,6-диметилікоз-14-ен-9-іл 5-бромопентаноат 73 (900 мг, неочищений) одержували у вигляді жовтого масла з (Z)-10-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-2,6-диметилікоз-14-ен-9-ола 72 (620 мг, 1.34 ммоль), EDC (500 мг, 2,6 ммоль) і 5-бромвалеріанової кислоти (500 мг, 2.56 ммоль). Rf 0,72 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 74

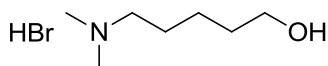


Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу 11, (Z)-10-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-2,6-диметиликоз-14-ен-9-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 74 (466 мг, 58% 2 стадії) одержували у вигляді безбарвного масла з (Z)-10-((Z)-дец-4-ен-1-іл)-2,6-диметиликоз-14-ен-9-іл-5-бромопентаноата 73 (900 мг, сирого) і диметиламіну (15 мл у вигляді розчину 2,0 М EtOH). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.43-5.29 (м, 4H), 4.94-4.88 (м, 1H), 2.32 (т, 2H), 2.26 (т, 2H), 2.15 (с, 6H), 2.08-1.93 (м, 8H), 1.70-1.00 (м, 43H), 0.95-0.83 (м, 15H). Rf 0.42 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Схема Синтезу для Сполуки 76

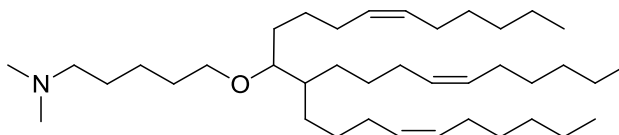


Синтез Сполуки 75



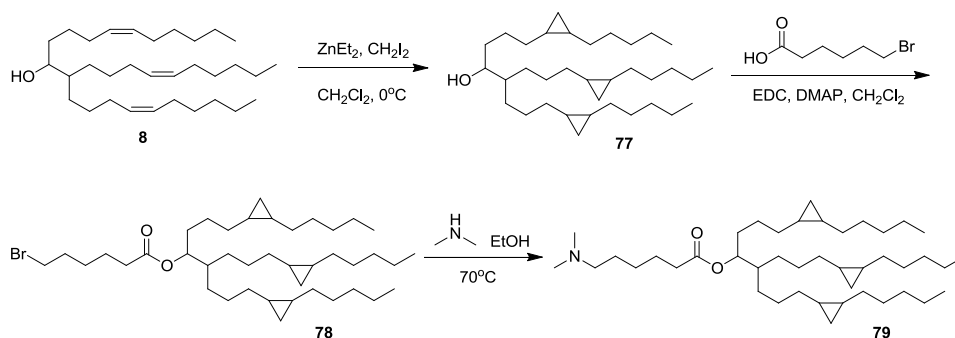
Розчин 5-бромпентан-1-ола (1,0 г, 5.99 ммоль) був підготовлений з диметиламіном (10 мл, у 2 М розчину в етанолі) у герметичній ємності, і нагрівали (80°C). Після перемішування (16 год) диметиламін і етанол видаляли при зниженому тиску з одержанням 5-(диметиламіно)пентан-1-ола 75 (1,26 г, кількісний вихід) у вигляді жовто-помаранчевої твердої речовини. Rf 0.25 (10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Синтез Сполуки 76

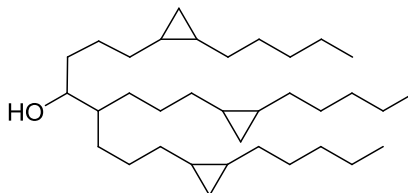


Відповідно до процедури, описаної для синтезу 62, 5-(((6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-іл)окси)-N,N-диметилпентан-1-амін 76 (864 мг, 37%) одержували у вигляді блідо-жовтого масла з (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-ен-1-іл)докоса-6,16-дієн-11-ілметансульфоната 61 (1,86 г, 3.45 ммоль), 5-(диметиламіно) пентан-1-ола 75 (1,26 г, 5.99 ммоль) і NaH (288 мг у вигляді 60% дисперсія в маслі, 7,2 ммоль). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.43-5.32 (м, 6H), 3.46-3.33 (м, 2H), 3.18-3.12 (м, 1H), 2.30-2.18 (м, 8H), 2.07-1.93 (м, 12H), 1.61-1.04 (м, 37H), 0.89 (т, 9H). Rf 0.47 (10% $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$).

Схема Синтезу для Сполуки 79



Синтез Сполуки 77

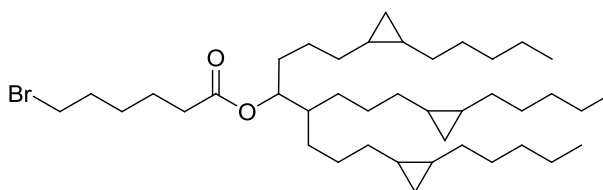


5

До охолодженого розчину (-15°C) (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ола 8 (5 г, 10,9 ммоль) в безводному дихлорметані (125 мл) в атмосфері азоту, був доданий по краплях діетиловий цинк (1 М у гексані, 82 мл, 81,8 ммоль) протягом 20 хвилин. Розчин перемішували протягом 70 хвилин при 0°C, потім обережно додавали дийодметан (6,6 мл, 81,8 ммоль). Розчин перемішували протягом ночі, дозволяючи йому нагрітися до кімнатної температури. Після закінчення цього, розчин виливали в крижану воду (350 мл) і розбавляли етилацетатом (450 мл). Потім додавали 5% HCl (350 мл), щоб допомогти пом'якшити емульсію, яка була створена. Органічний шар промивали насиченими NaHCO₃ (СБ водн. 500 мл), водою (500 мл) і сольовим розчином (500 мл). Об'єднані водні шари знову екстрагували етилацетатом. Об'єднані органічні екстракти сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху. Залишок очищали за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі (2,5% етилацетату в гексанах) з одержанням масла рожевого кольору. Щоб видалити колір, (I₂), очищений продукт розчиняли у дихлорметані (150 мл) і промивали Na₂S₂O₃ (насич. вод. 2 x 40 мл) із одержанням 1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-ола 77 у вигляді блідо-жовтого масла (5,54 г, 96.5%).

20

Синтез Сполуки 78

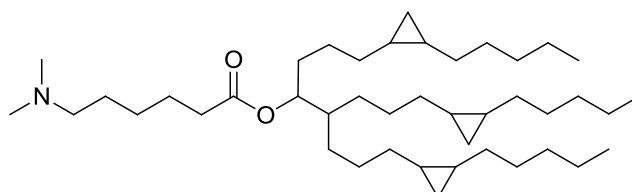


25

Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ол 6 бромогексаноата 10, 1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-іл-6 бромогексаноат був одержаний у вигляді неочищеного масла з 1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-іл 6-(диметиламіно)кислоти (0,75 г, 1,5 ммоль), гексану, безводного дихлорметану (5.2 мл), 6-бромгексанової кислоти (0,88 г, 4,5 ммоль), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід гідрохлориду (0,87 г, 4,5 ммоль) і 4-диметиламінопіридину (5 мг). Продукт використовували на наступній стадії без додаткового очищення.

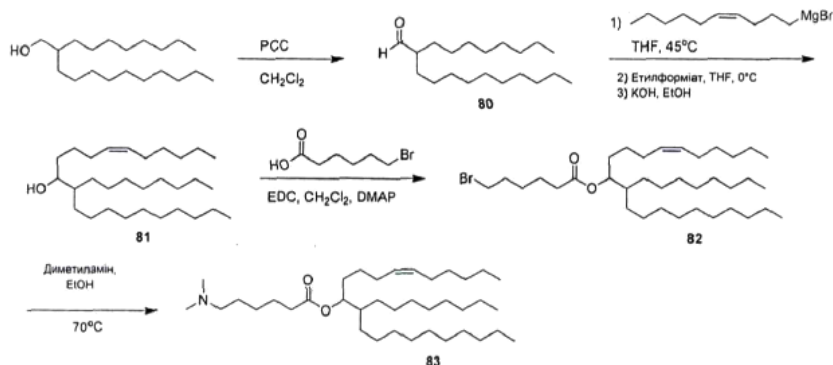
30

Синтез Сполуки 79

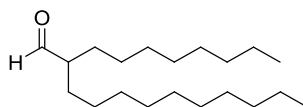


Відповідно до процедури, що описана для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 6-(диметиламіно)гексаноата 11, одержували у вигляді масла (0,56 г, 59%) з 1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-іл-6 бромогексаноата (1,0 г, 1,5 ммоль) і 2,0 М розчину диметиламіну в етанолі (3,5 мл). Rf 0.50 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

Схема Синтезу для Сполуки 83

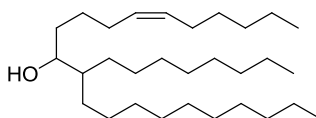


Синтез Сполуки 80



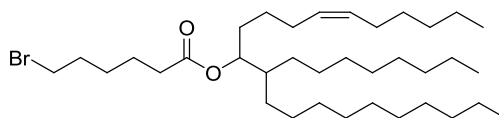
До розчину 2-октилдодекан-1-ола (20 г, 67,0 ммоль) у безводному дихлорметані (500 мл) додавали піридинійхлорхромат (43,2 г, 200 ммоль). Розчин перемішували протягом 3 годин при кімнатній температурі, потім фільтрували через шар двоокису кремнію, елюючи сумішшю дихлорметану з одержанням 2-октилдодеканал 80 у вигляді безбарвного масла (10,5 г, 50%).

Синтез Сполуки 81



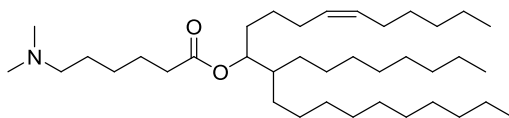
Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу (6Z, 15Z)-хенікоза 6,15-дієн-11-ола 4, (Z)-12-октилдокос-6-ен-11-ол 81 одержували у вигляді безбарвного масла (0,67 г, 92%) з 2-октилдодеканаля 80 (0,5 г, 1,6 ммоль), (Z)-1-бромодек-4-ена (0,7 г, 3,1 ммоль), магнію (80 мг, 3,4 ммоль), безводного тетрагідрофурану (0,5 мл), води (2 мл), етанолу (2 мл) і KOH (0,2 г, 2,8 ммоль).

Синтез Сполуки 82



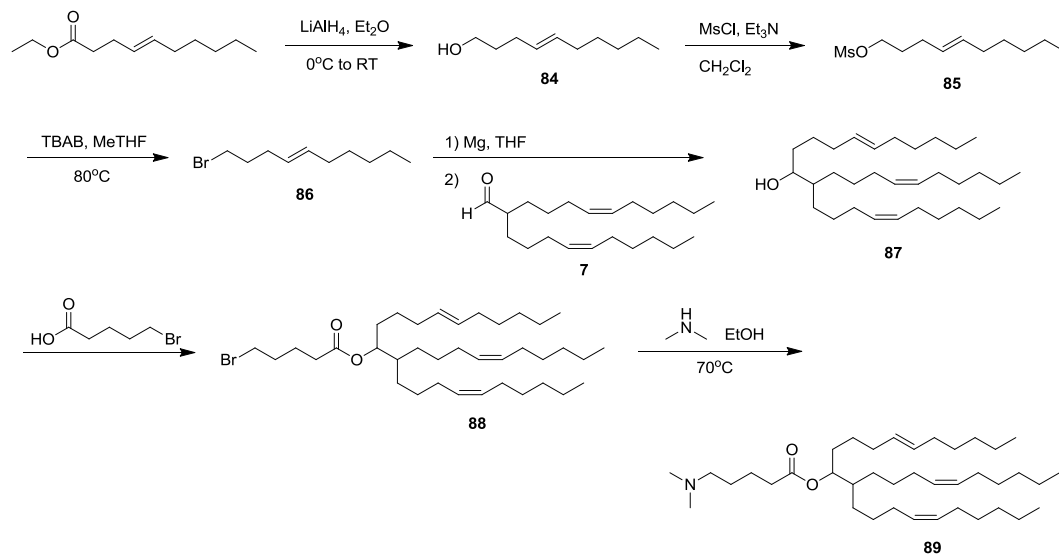
Використавши процедуру, аналогічну тій, що описана для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 6-бромогексаноата 10, (Z)-12-октилдокос-6-ен-11-іл-6 бромогексаноат 82 одержували у вигляді безбарвного масла (0,78 г, 85%) з (Z)-12-октилдокос-6-ен-11-ола 81 (0,67 г, 1,5 ммоль), безводного дихлорметану (5 мл), 6-бромгексанової кислоти (0,80 г, 4,4 ммоль), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід гідрохлорида (0,85 г, 4,4 ммоль) і 4-диметиламінопіридина (5 мг). Продукт використовують на наступній стадії без додаткового очищення.

Синтез Сполуки 83

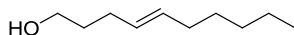


Відповідно до процедури, що описана що для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл) докоса-6,16-дієн-11-іл 6-(диметиламіно)гексаноата 11, (Z)-12-октилдокос-6-ен-11-іл 6-(диметиламіно)гексаноат 83 був одержаний у вигляді масла (103 мг, 14%) з (Z)-12-октилдокос-6-ен-11-іл 6-бромогексаноата 82 (0,78 г, 1,3 ммоль) і 2,0 М розчину диметиламіну в етанолі (3 мл). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.43-5.26 (м, 2H), 4.96-4.91 (м, 1H), 2.33 (т, 4H), 2.26 (с, 6H), 2.08-1.93 (м, 4H), 1.70-1.60 (м, 2H), 1.57-1.43 (м, 4H), 1.40-1.15 (м, 43H), 0.94-0.85 (м, 9H).

Схема Синтезу для Сполуки 89

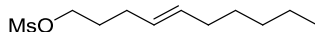


Синтез Сполуки 84



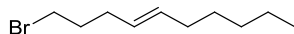
До охолодженого розчину (0°C) (E)-етил дец-4-еноата (20 г, 101 ммоль) у безводному діетиловому ефірі (350 мл) додавали гідрид літію (8,9 г, 212 ммоль) в атмосфері азоту. Розчин перемішували протягом 1 години при кімнатній, потім охолоджували до 0°C і гасили повільно, за допомогою 5M NaOH (30 мл), і розбавляли діетиловим ефіром (100 мл). Розчин перемішували протягом 30 хв. і сушили сульфатом магнію, фільтрували і концентрували у вакуумі насуху з одержанням (E)-дец-4-ен-1-ола 84, у вигляді масла (16,1 г, кількісний вихід).

Синтез Сполуки 85



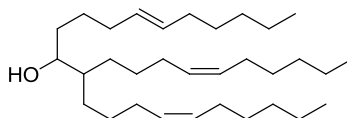
Відповідно до процедури, що описана що для синтезу (Z)-дец-4-еніл метансульфоната 2, (E)-дец-4-еніл метансульфонат 85 був одержаний у вигляді помаранчевого масла (32,7 г) з (E)-дец-4-ен-1-ола (16,1 г, 94,7 ммоль), триетиламіну (15,5 мл, 111,7 ммоль) і метансульфонілхлорида (15,6 мл, 201,7 ммоль). R_f 0.65 (100% CH_2Cl_2).

Синтез Сполуки 86



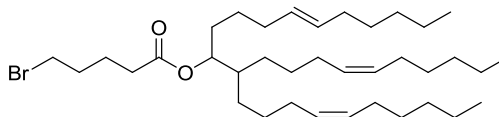
Відповідно до процедури, що описана що для синтезу (Z)-1-бромодек-4-ена 3, (E)-1-бромодек-4-ен 86 одержували у вигляді масла (17,9 г, 81%) з (E)-дец-4-еніл метансульфоната 85 (23,5 г, 94,7 ммоль) і броміду тетрабутиламонію (40,0 г, 124,1 ммоль). R_f 0,85 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 87



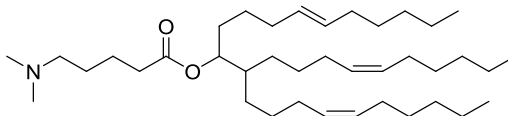
Відповідно до процедури, що описана що для синтезу з одержанням (6Z, 15Z)-хенікоза 6,15-дієн-11-ола 4, (6E, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ол 87 у вигляді масла (1,28 г, 71%) одержували з (E)-1-бромодек-4-ена 86 (1,7 г, 7,8 ммоль), магнієвих стружок (0,19 г, 7,8 ммоль), (Z)-2-((Z)-дец-4-еніл)додец-6-оля 7 (1,25 г, 3,9 ммоль) і гідроксиду калію (0,66 г, 11,7 ммоль). Rf 0,43 (10% етилацетат-гексани).

Синтез Сполуки 88



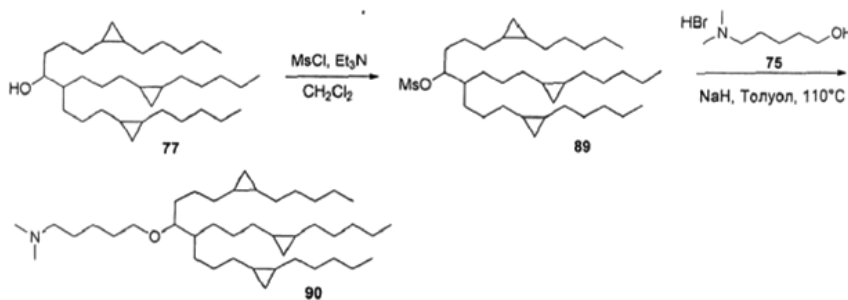
Відповідно до процедури, що описана що для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 6-бромогексаноата 10, (6E, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)-докоса 6,16-дієн-11-іл-5 бромопентаноат 88 одержували у вигляді масла (1,36 г, 78%) з (6E, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-ола 87 (1,28 г, 2,8 ммоль) і 5-бром-N-валеріанової кислоти (1,00 г, 5,6 ммоль), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (1,06 г, 5,6 ммоль), діізопропілетиламіна (1,1 г, 83,0 ммоль) і диметиламінопіридина (10 мг).

Синтез Сполуки 89

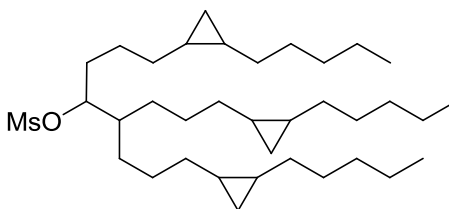


Відповідно до процедури, що описана для синтезу (6Z, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 6-(диметиламіно)гексаноата 11, (6E, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл 5-(диметиламіно)пентанової кислоти 89 одержували у вигляді масла (0,45 г, 35%) з (6E, 16Z)-12-((Z)-дец-4-еніл)докоса-6,16-дієн-11-іл-5 бромопентаноата 88 (1,36 г, 2,2 ммоль) і 2 М диметиламіну в етанолі (5 мл). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5.45-5.28 (м, 6H), 4.96-4.91 (м, 1H), 2.34-2.25 (м, 2H), 2.06-1.90 (м, 12H), 1.68-1.61 (м, 2H), 1.55-1.45 (м, 5H), 1.45-1.16 (м, 28H), 0.95-0.84 (м, 9H). Rf 0.46 (10% MeOH- CH_2Cl_2).

Схема Синтезу для Сполуки 90

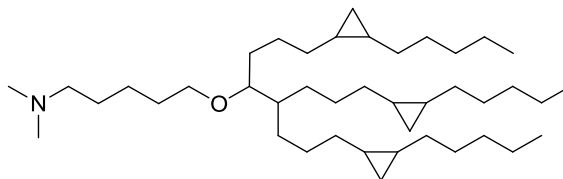


Синтез Сполуки 89



Відповідно до процедури, що описана для синтезу 5, 1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-іл метансульфонат 89 одержували у вигляді безбарвного масла.

5 Синтез Сполуки 90



Відповідно до процедури, що описана що для синтезу 62, 5-((1,8-біс(2-пентилциклопропіл)-5-(3-(2-пентилциклопропіл)пропіл)октан-4-іл)окси)-N,N-диметилпентан-1-амін 90 (580 мг) одержували у вигляді блідо-жовтого масла. Rf 0.48 (10% MeOH-CH₂Cl₂).

[0443] Слід розуміти, що наведений вище опис призначений для ілюстрації, а не обмеження. Багато варіантів будуть очевидні фахівцям у даній області техніки після прочитання наведеного вище опису. Обсяг цього винаходу повинен, отже, бути визначений не із посиланням на наведений вище опис, а замість цього має бути визначений із посиланням на формулу винаходу, що додається, разом із повним обсягом еквівалентів, до яких такі вимоги можуть бути пре'явлені. Розкриття всіх статей і посилань, у тому числі патентних заявок, патентів, публікацій РСТ, і зразків з ГенБанк і послідовностей, описаних у ньому, включене у цей опис шляхом посилання для всіх цілей.

20

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Ліпід, що має структурну формулу (I):

X-A-Y-Z, (I)

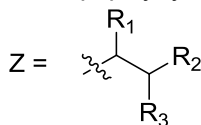
25 або його сіль, де:

X є C₁-C₆алкіламіногрупою;

A є C₁-C₆алкілом;

Y вибраний з групи, що складається з складного ефіру, карбамату та ефіру; і

Z має формулу:



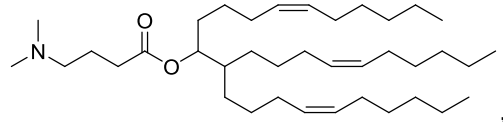
де R₁, R₂ і R₃, кожен окремо, вибрані з групи, що складається з C₈-C₁₁алкілу, причому кожен з R₁, R₂ і R₃ незалежно може бути насиченим або ненасиченим, і кожен з R₁, R₂ і R₃ може містити циклоалкільний фрагмент і може бути незаміщений або заміщений C₁-C₆алкілом.

35 2. Ліпід за п. 1, який **відрізняється** тим, що кожен з алкільних ланцюгів в R₁, R₂ і R₃ має довжину від C₉ до C₁₀.

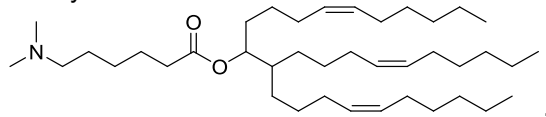
3. Ліпід за п. 1, який **відрізняється** тим, що щонайменше один з алкільних ланцюгів в R₁, R₂ і R₃ містить циклоалкільний фрагмент та/або подвійний зв'язок.

4. Ліпід за п. 1, який **відрізняється** тим, що X вибраний з групи, що складається з диметиламіно-, діетиламіно- і етилметиламіногрупи.

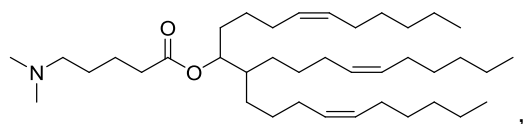
40 5. Ліпід, який вибраний з групи, що складається з:



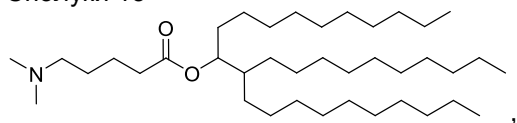
Сполуки 9



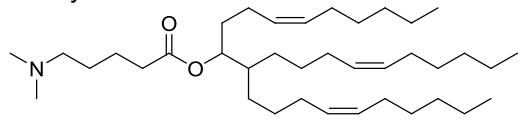
Сполуки 11



Сполуки 13

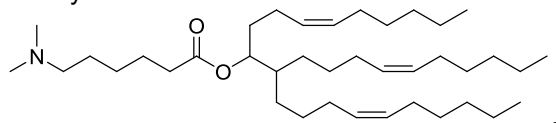


Сполуки 14

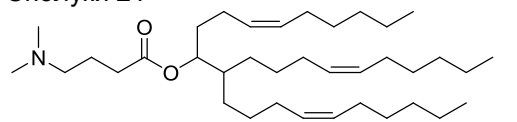


5

Сполуки 19

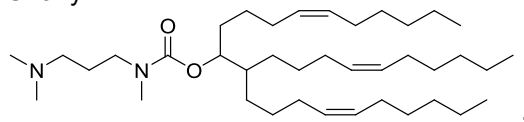


Сполуки 21

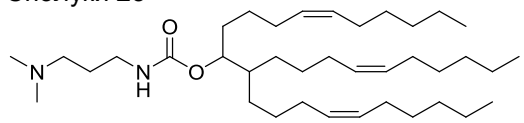


10

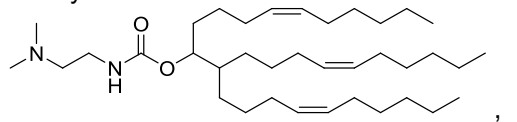
Сполуки 22



Сполуки 23

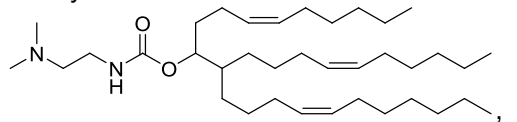


Сполуки 24

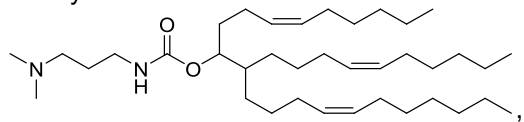


15

Сполуки 25

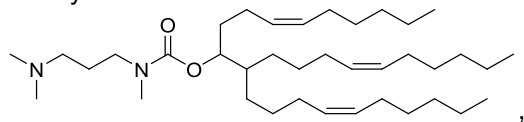


Сполуки 26

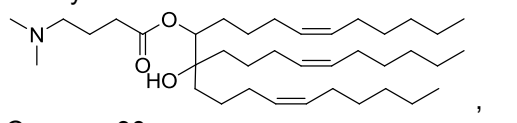


20

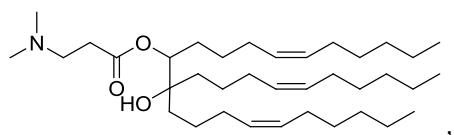
Сполуки 27



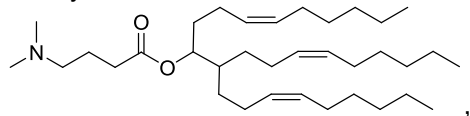
Сполуки 28



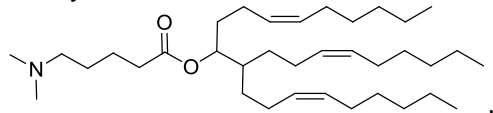
Сполуки 30



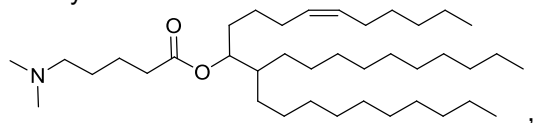
Сполуки 31



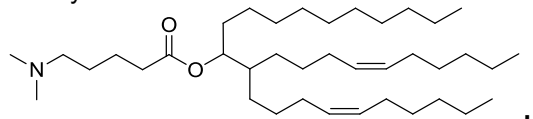
Сполуки 40



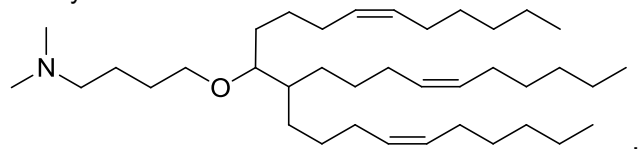
Сполуки 42



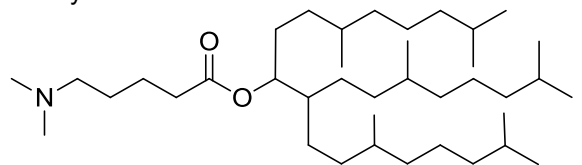
Сполуки 50



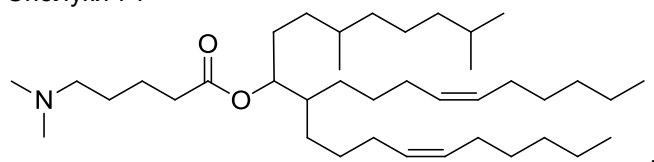
Сполуки 53



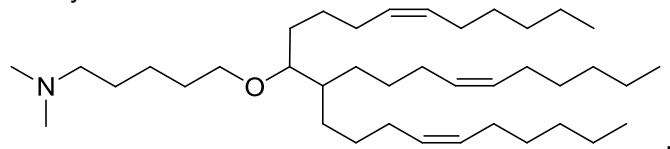
Сполуки 62



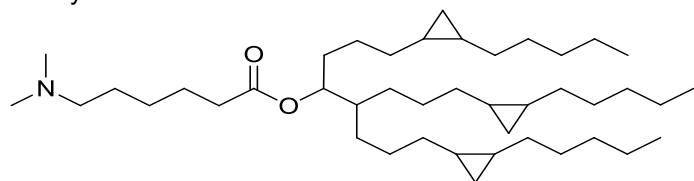
Сполуки 71



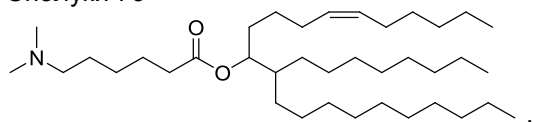
Сполуки 74



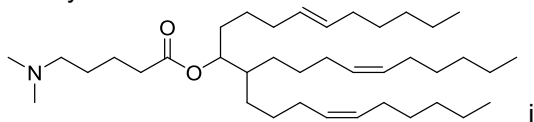
Сполуки 76



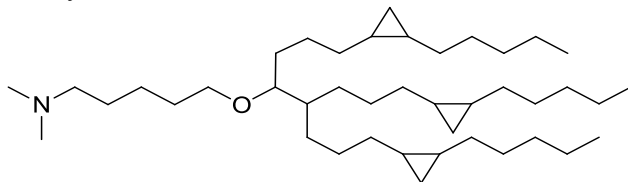
Сполуки 79



Сполуки 83



Сполуки 89



5 Сполуки 90

або його сіль.

6. Система доставки, яка являє собою ліпідну частинку, що містить ліпід за будь-яким з попередніх пунктів.

10 7. Система доставки за п. 6, яка **відрізняється** тим, що частка додатково містить некатіонний ліпід.

8. Система доставки за п. 7, яка **відрізняється** тим, що некатіонний ліпід вибраний з групи, що складається з фосфоліпиду, холестерину або суміші фосфоліпиду і холестерину.

9. Система доставки за п. 8, яка **відрізняється** тим, що фосфоліпід містить дипальмітоїлфосфатидилхолін (DPPC), дистеароїлфосфатидилхолін (DSPC) або їх суміш.

15 10. Система доставки за п. 6, яка **відрізняється** тим, що частинка додатково містить кон'югований ліпід, який інгібує агрегацію частинок.

11. Система доставки за п. 10, яка **відрізняється** тим, що кон'югований ліпід, який інгібує агрегацію частинок, містить поліетиленгліколь (PEG)-ліпідний кон'югат.

20 12. Система доставки за п. 6, яка **відрізняється** тим, що додатково містить терапевтичний агент.

13. Система доставки за п. 12, яка **відрізняється** тим, що терапевтичний агент є інтерферуючою РНК, яка вибрана з групи, що складається з малої інтерферуючої РНК (міРНК), асиметричної інтерферуючої РНК (аіРНК), мікроРНК (мікроРНК), дайсер-субстратної РНК (дсРНК), малої шпильки РНК (мшРНК) і їх сумішей.

25 14. Система доставки за п. 12, яка **відрізняється** тим, що ліпідна частинка має масове співвідношення ліпід:терапевтичний агент від близько 5:1 до близько 15:1.

15. Фармацевтична композиція, яка містить систему за п. 6 і являє собою ліпідну частинку та фармацевтично прийнятний носій.

30 16. Спосіб введення терапевтичного агента у клітину, що включає контактування клітини з системою доставки за п. 12.

17. Спосіб для доставки *in vivo* терапевтичного агента, що включає введення ссавцеві ліпідної частинки за п. 12.

18. Спосіб лікування захворювань або порушень у ссавця, який потребує цього, що включає введення ссавцеві терапевтично ефективною кількістю ліпідної частинки за п. 12.

35 19. Спосіб за п. 18, який **відрізняється** тим, що захворювання або порушення вибрано з групи, що складається з вірусної інфекції, захворювання або порушення печінки і раку.

20. Ліпід за п. 1, який **відрізняється** тим, що R₁, R₂ та R₃ є незаміщеними.

21. Система доставки за п. 12, яка **відрізняється** тим, що терапевтичний агент є матричною РНК (мРНК).

40

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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