

M104.D1.SM.1DE

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3 431 076

"Formulazione lipidica migliorata"

Arbutus Biopharma Corporation,

con sede a Burnaby, BC (Canada)

* * * * *

DESCRIZIONE

L'invenzione è relativa al campo del rilascio di agenti terapeutici usando particelle lipidiche. In particolare, la presente invenzione è relativa a particelle lipidiche comprendenti un lipide cationico specifico, una composizione farmaceutica comprendente dette particelle lipidiche, e metodi per produrre ed utilizzare le medesime.

Acidi nucleici terapeutici includono, ad esempio, piccolo RNA interferente (siRNA), micro RNA (miRNA), oligonucleotidi antisenso, ribozimi, plasmidi, e acidi nucleici immunostimolanti. Questi acidi nucleici agiscono attraverso una varietà di meccanismi. Nel caso di siRNA o miRNA, questi acidi nucleici possono modulare negativamente i livelli intracellulari di proteine specifiche attraverso un processo denominato RNA interferenza (RNAi). Successivamente all'introduzione di siRNA o miRNA nel citoplasma cellulare, questi costrutti di RNA a doppio filamento possono legarsi a una proteina denominata RISC. Il filamento senso di siRNA o di miRNA iè spostato dal complesso RISC fornendo uno stampo all'interno di RISC che può riconoscere e legarsi a mRNA con una sequenza complementare a quella di siRNA o miRNA. Avendo legato l'mRNA complementare, il complesso RISC scinde l'mRNA e

M104.D1.SM.1DE

rilascia i filamenti scissi. RNAi può fornire modulazione negativa di proteine specifiche mirando la distruzione specifica del corrispondente mRNA che codifica la sintesi proteica.

Le applicazioni terapeutiche di RNAi sono estremamente ampie, poiché i costrutti siRNA e miRNA possono essere sintetizzati con qualsiasi sequenza nucleotidica diretta contro una proteina bersaglio. Finora, i costrutti di siRNA hanno mostrato la capacità di regolare negativamente in modo specifico proteine bersaglio sia in modelli *in vitro* sia in modelli *in vivo*. Inoltre, i costrutti di siRNA sono attualmente valutati in studi clinici.

Tuttavia, due problemi attualmente affrontati dai costrutti siRNA o miRNA sono in primo luogo la loro sensibilità alla digestione nucleasica nel plasma e in secondo luogo la loro capacità limitata a ottenere l'accesso allo scomparto intracellulare in cui essi si legano a RISC quando somministrati per via sistemica come siRNA o miRNA liberi. Questi costrutti a doppio filamento possono essere stabilizzati mediante incorporazione di linker nucleotidici chimicamente modificati all'interno della molecola, ad esempio, gruppi fosforioato. Tuttavia, queste modificazioni chimiche forniscono soltanto protezione limitata dalla digestione nucleasica e possono ridurre l'attività del costrutto. Il rilascio intracellulare di siRNA o miRNA può essere facilitato dall'uso di sistemi veicolo quali polimeri, liposomi cationici o mediante modificazione chimica del costrutto, ad esempio, mediante attacco covalente di molecole di colesterolo. Tuttavia, sistemi di rilascio migliorato sono necessari

M104.D1.SM.1DE

per aumentare la potenza delle molecole di siRNA e miRNA e ridurre o eliminare la necessità di modificazione chimica.

Oligonucleotidi antisenso e ribozimi possono anche inibire la traduzione di mRNA nella proteina. Nel caso di costrutti antisenso, questi acidi deossinucleici a singolo filamento hanno una sequenza complementare a quella di mRNA della proteina bersaglio e possono legarsi a mRNA mediante appaiamento delle basi di Watson-Crick. Questo legame o previene la traduzione di mRNA bersaglio e/o innesca la degradazione di RNasi H dei trascritti di mRNA. Di conseguenza, oligonucleotidi antisenso hanno un forte potenziale di specificità d'azione (ossia, modulazione negativa di una specifica proteina associata alla malattia). Attualmente, questi composti hanno mostrato premesse in parecchi modelli *in vitro* e *in vivo*, inclusi modelli di malattia infiammatoria, cancro e HIV (analizzato in Agrawal, *Trends in Biotech.* 14:376-387 (1996)). L'antisenso può anche influenzare l'attività cellulare ibridando in modo specifico con DNA cromosomiale. Valutazioni cliniche umane avanzate di parecchi farmaci antisenso sono attualmente in corso. I bersagli per questi farmaci includono geni *bcl2* e apolipoproteina B e prodotti di mRNA.

Acidi nucleici immunostimolanti includono acidi deossiribonucleici e acidi ribonucleici. Nel caso di acidi deossiribonucleici, alcune sequenze o motivi hanno mostrato generare stimolazione immunitaria nei mammiferi. Queste sequenze o motivi includono il motivo CpG, sequenze ricche di pirimidina e sequenze palindromiche. Si ritiene che il motivo CpG negli acidi deossiribonucleici sia particolarmente

M104.D1.SM.1DE

ricosciuto da un recettore endosomiale, il recettore toll-simile 9 (TLR-9), che innesca la via di stimolazione immunitaria sia innata sia acquisita. Alcune sequenze di acido ribonucleico immunostimolanti sono anche state riportate. Si ritiene che queste sequenze di RNA inneschino l'attivazione immunitaria legando i recettori toll-simili 6 e 7 (TLR-6 e TLR-7). Inoltre, RNA a doppio filamento è anche indicato come immunostimolante e si ritiene attivi attraverso il legame a TLR-3. Un problema ben noto relativamente all'uso di acidi nucleici terapeutici è relativo alla stabilità del legame internucleotidico fosfodiesterico e alla suscettibilità di questo linker a nucleasi. La presenza di esonucleasi ed endonucleasi nel siero determina una rapida digestione di acidi nucleici e che possiedono legami fosfodiesterici e pertanto gli acidi nucleici terapeutici possono avere emivite molto brevi in presenza di siero o all'interno di cellule (Zelphati, O., *et al.*, *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); e Thierry, A.R., *et al.*, pp. 147-161 in *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Ed. Erickson, RP e Izant, JG; Raven Press, NY (1992)). L'acido nucleico terapeutico essendo attualmente sviluppato non impiega la chimica di fosfodiesterico basica che si trova negli acidi nucleici naturali a causa di questi e ulteriori problemi.

Questo problema è stato parzialmente superato mediante modificazioni chimiche che riducono il siero o la degradazione intracellulare. Si sono testate modificazioni sul ponte fosfodiesterico internucleotidico (ad esempio, usando legami fosforotioato, metil-

M104.D1.SM.1DE

fosfonato o fosforamidato), sulla base nucleotidica (ad esempio, 5-propinil-pirimidine), o sullo zucchero (ad esempio, zuccheri 2'-modificati) (Uhlmann E., *et al.* Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer, Vol. X., pagg. 64-81 Academic Press Inc. (1997)). Altri hanno tentato di migliorare la stabilità usando legami di zucchero 2'-5' (si veda, ad esempio, il brevetto US n. 5.532.130). Altre modifiche sono state tentate. Tuttavia, nessuna di queste soluzioni è risultata interamente soddisfacente e gli acidi nucleici terapeutici liberi *in vivo* hanno ancora soltanto efficacia limitata.

Inoltre, come sopra indicato relativamente a siRNA e miRNA, rimangono problemi circa la capacità limitata di acidi nucleici terapeutici ad attraversare le membrane cellulari (si veda, Vlassov, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) e nei problemi associati alla tossicità sistemica, quali anafilassi mediata da complemento, proprietà co-regolatrici alterate e citopenia (Galbraith, *et al.*, *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

Per tentare di migliorare l'efficacia, i ricercatori hanno anche impiegato sistemi veicolo a base lipidica per rilasciare acidi nucleici terapeutici chimicamente modificati o non modificati. In Zelphati, O. e Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), gli autori fanno riferimento all'uso di liposomi anionici (convenzionali), a liposomi pH sensibili, immunoliposomi, liposomi fusogenici, e aggregati lipide/antisense cationici. Similmente siRNA è stato somministrato a livello sistemico in liposomi cationici e queste particelle acido nucleico-lipide sono state riportate fornire

M104.D1.SM.1DE

modulazione negativa migliorata di proteine bersaglio in mammiferi inclusi primati non umani (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111-114 (2006)).

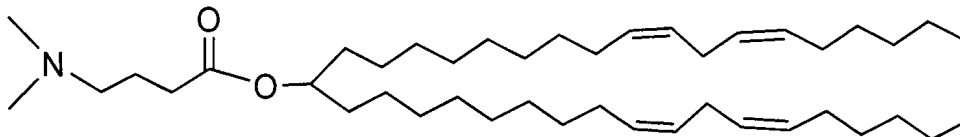
In questo contesto, WO 2008/042973 A2 descrive composizioni e metodi utili nella somministrazione di terapie a base di acido nucleico, quali liposomi e lipocomplessi. Inoltre, US 2003/0229037 A1 descrive un anfifilo cationico per facilitare il trasporto di molecole biologicamente attive nelle cellule, detto anfifilo comprendendo un'ancora lipidica, un gruppo spaziatore e un gruppo di testa.

Nonostante il progresso recente, rimane la necessità nella tecnica di composizioni di acido nucleico-lipide terapeutiche migliorate che siano adeguate per uso terapeutico generico. Preferibilmente, queste composizioni incapsulerebbero gli acidi nucleici con elevata efficienza, avrebbero rapporti farmaco-lipide elevati, proteggerebbero l'acido nucleico incapsulato dalla degradazione e dalla clearance nel siero, sarebbero adeguate per il rilascio sistemico e fornirebbero rilascio intracellulare dell'acido nucleico incapsulato. Inoltre, queste particelle di acido nucleico lipidiche dovrebbero essere ben tollerate e fornire un indice terapeutico adeguato, in modo tale che il trattamento del paziente a una dose efficace dell'acido nucleico non sia associato a notevole tossicità e/o rischio per il paziente. La presente invenzione fornisce tali composizioni, metodi per produrre le composizioni e usi delle composizioni per introdurre gli acidi nucleici in cellule,

incluso per il trattamento di malattie.

La presente invenzione è relativa ai seguenti elementi:

1. Una particella lipidica comprendente un lipide cationico di formula I:



Formula I

o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

2. La particella lipidica secondo il punto 1, in cui la particella lipidica comprende inoltre un lipide naturale e un lipide in grado di ridurre l'aggregazione delle particelle.
3. La particella lipidica secondo il punto 1 o il punto 2, comprendente inoltre un agente terapeutico.
4. La particella lipidica secondo il punto 3, in cui l'agente terapeutico è un acido nucleico scelto dal gruppo che consiste di un plasmide, un oligonucleotide immunostimolatorio, un oligonucleotide a filamento singolo, un oligonucleotide a filamento doppio, un aptamero o un ribozima.
5. La particella lipidica secondo il punto 4, in cui l'agente terapeutico è un siRNA, o in cui l'agente terapeutico è una sequenza di mRNA che codifica un polipeptide utile terapeuticamente.
6. Una composizione farmaceutica comprendente la particella lipidica secondo uno qualsiasi dei punti da 1 a 5 ed un eccipiente, veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile.

M104.D1.SM.1DE

7. Un metodo *in vitro* per la modulazione dell'espressione di un gene bersaglio in una cellula, il metodo comprendendo fornire ad una cellula una particella lipidica secondo uno qualsiasi dei punti da 1 a 5, o un composizione farmaceutica secondo il punto 6.

8. Una particella lipidica secondo uno qualsiasi dei punti da 1 a 5 o una composizione farmaceutica secondo il punto 6 per uso in un metodo *in vivo* per la modulazione dell'espressione di un gene bersaglio in una cellula.

9. Il metodo secondo il punto 7, o la particella lipidica o composizione farmaceutica per uso secondo il punto 8, il cui il gene bersaglio è scelto dal gruppo che consiste di fattore VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gene PDGF beta, gene Erb-B, gene Src, gene CRK, gene GRB2, gene RAS, gene MEKK, gene JNK, gene RAF, gene Erkl/2, gene PCNA(p21), gene MYB, gene JUN, gene FOS, gene BCL-2, gene Ciclina D, gene VEGF, gene EGFR, gene Ciclina A, gene Ciclina E, gene WNT-I, gene beta-catenina, gene c-MET, gene PKC, gene NFkB, gene STAT3, gene survivina, gene Her2/Neu, gene della topoisomerasi I, gene alfa della topoisomerasi II, gene p73, gene p21(WAF1/CIP1), gene p27(KIP1), gene PPM1D, gene caveolina I, gene MIB I, gene MTAI, gene M68, mutazioni in geni soppressori di tumori, gene soppressore di tumori, gene soppressore di tumori p53, e loro combinazioni.

10. La particella lipidica secondo il punto 3 o la composizione farmaceutica secondo il punto 6 per uso nel trattare una

M104.D1.SM.1DE

malattia o disturbo caratterizzato dalla sovraespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto una particella lipidica secondo il punto 3 o una composizione farmaceutica secondo il punto 6, in cui l'agente terapeutico è scelto fra siRNA, un microRNA o un oligonucleotide antisenso, e un plasmide capace di esprimere un microRNA o un oligonucleotide antisenso, e in cui il siRNA, microRNA o RNA antisenso comprendono un polinucleotide che si lega specificatamente ad un polinucleotide che codifica il polipeptide, o un suo complemento.

11. La composizione farmaceutica secondo il punto 6 per uso nel trattare una malattia o disturbo caratterizzato dalla sovraespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto la composizione farmaceutica secondo il punto 6, in cui l'agente terapeutico è un plasmide che codifica il polipeptide o una sua variante o frammento funzionali.

12. La composizione farmaceutica secondo il punto 6 per uso in un metodo per indurre una risposta immunitaria in un soggetto, il metodo comprendendo fornire al soggetto la composizione farmaceutica secondo il punto 6, in cui l'agente terapeutico è un oligonucleotide immunostimolatorio.

13. Un vaccino comprendente la particella lipidica secondo uno qualsiasi dei punti da 1 a 5, ed un antigene associato ad una malattia o agente patogeno.

14. Un metodo per la preparazione di una particella lipidica

M104.D1.SM.1DE

secondo i punti 4 o 5, comprendente le fasi di:

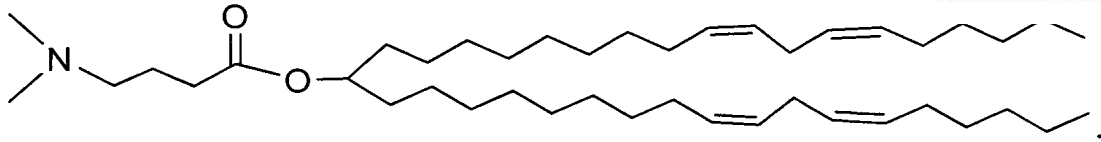
- (i) combinare una miscela di lipidi con una soluzione acquosa tamponata di acido nucleico per produrre una miscela intermedia contenente acido nucleico incapsulato in particelle lipidiche, in cui gli acidi nucleici incapsulati sono presenti in un rapporto acido nucleico/lipide dal 3% in peso al 25% in peso; e
- (ii) aumentare il pH per neutralizzare almeno una porzione delle cariche di superficie sulle particelle di lipide-acido nucleico.

Si descrivono qui nuovi lipidi cationici nonché particelle lipidiche comprendenti gli stessi. Queste particelle lipidiche possono inoltre comprendere un agente attivo e possono essere usate secondo metodi correlati per rilasciare il principio attivo ad una cellula.

Il lipide descritto qui può contenere una o più forme isomeriche. Tutte tali forme isomeriche di questo composto sono espressamente incluse qui. Il composto descritto qui può anche contenere legami (ad esempio, legami carbonio-carbonio) o sostituenti che possono limitare la rotazione del legame, ad esempio restrizione risultante dalla presenza di un doppio legame. Di conseguenza, tutti gli isomeri *cis/trans* ed *E/Z* sono espressamente inclusi qui.

In un aspetto, sono descritte qui formulazioni lipidiche migliorate comprendenti un lipide cationico di formula I, in cui la formula I è:

M104.D1.SM.1DE



La formula I può anche essere indicata come DLin-M-C3-DMA, MC3 o M-C3. Ognuna delle formule I, DLin-M-C3-DMA, MC3 e M-C3 ha la formula come immediatamente sopra indicato.

Le formulazioni lipidiche comprendono anche tipicamente un lipide neutro, uno sterolo e un lipide PEG o PEG-modificato.

In un aspetto, la formulazione lipidica migliorata include anche un lipide di bersagliamento (ad esempio, un lipide contenente GalNAc e/o folato).

Si descrive qui la preparazione per le formulazioni lipidiche migliorate attraverso un metodo di estrusione o un metodo di miscelazione in linea.

Si descrive qui un metodo di somministrazione delle formulazioni lipidiche migliorate contenenti un costrutto a base di RNA a un animale, e la valutazione dell'espressione del gene bersaglio.

In un aspetto, una formulazione lipidica caratterizzata qui, quale una formulazione lipidica complessata con un oligonucleotide, quale un RNA a doppio filamento (dsRNA), può essere usato per modificare (ad esempio, ridurre) l'espressione di un gene bersaglio in una cellula tumorale in vivo o in vitro. In alcune forme di realizzazione, una formulazione lipidica, caratterizzata qui può essere usata per modificare l'espressione del gene bersaglio in una linea di cellule tumorali, incluse senza limitazione, le linee cellulari HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2,

M104.D1.SM.1DE

Skov3, U87, e PC3.

Si descrive qui una particella lipidica comprendente il lipide della presente invenzione. In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica comprende inoltre un lipide neutro e un lipide in grado di ridurre l'aggregazione particellare. In una forma di realizzazione, la particella lipidica consiste sostanzialmente di (i) almeno un lipide descritto qui; (ii) un lipide neutro selezionato tra DSPC, DPPC, POPC, DOPE e SM; (iii) sterolo, ad esempio colesterolo; e (iv) peg-lipide, ad esempio PEG-DMG o PEG-cDMA, in un rapporto molare di circa 20-60% di lipide cationico: 5-25% di lipide neutro: 25-55% di sterolo; 0,5-15% di PEG-lipide. In una forma di realizzazione, il lipide descritto qui è otticamente puro.

In ulteriori forme di realizzazione correlate, sono descritte nella presente particelle lipidiche che comprendono inoltre un agente terapeutico. In una forma di realizzazione, l'agente terapeutico è un acido nucleico. In una forma di realizzazione, l'acido nucleico è un plasmide, un oligonucleotide immunostimolatore, un oligonucleotide a singolo filamento, ad esempio un oligonucleotide antisense, un antagomir; un oligonucleotide a doppio filamento, ad esempio un siRNA; un aptamero o un ribozima.

In un'altra forma di realizzazione correlata, è descritta qui una composizione farmaceutica comprendente una particella lipidica descritta nella presente e un eccipiente, veicolante o diluente farmaceuticamente accettabile.

Si descrive qui, in altre forme di realizzazione correlate, un

M104.D1.SM.1DE

metodo di modulazione dell'espressione di un gene bersaglio in una cellula, il metodo comprendendo il fornire a una cellula una particella lipidica o una composizione farmaceutica descritta qui Il gene bersaglio può essere un gene di tipo selvaggio. In un'altra forma di realizzazione, il gene bersaglio contiene una o più mutazioni. In una particolare forma di realizzazione, il metodo comprende la modulazione specifica dell'espressione di un gene bersaglio contenente una o più mutazioni. In forme di realizzazione particolari, la particella lipidica comprende un agente terapeutico selezionato da un oligonucleotide immunostimolatore, un oligonucleotide a singolo filamento, ad esempio un oligonucleotide antisense, un antagomir; un oligonucleotide a doppio filamento, ad esempio un siRNA, un aptamero, un ribozima. In una forma di realizzazione, l'acido nucleico è plasmide che codifica un siRNA, un oligonucleotide antisense, un aptamero o un ribozima.

In un aspetto, il gene bersaglio è selezionato dal gruppo costituito dal fattore VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, dal gene beta PDGF, dal gene Erb-B, dal gene Src, dal gene CRK, dal gene GRB2, dal gene RAS, dal gene MEKK, dal gene JNK, dal gene RAF, dal gene Erk1/2, dal gene PCNA(p21), dal gene MYB, dal gene JUN, dal gene FOS, dal gene BCL-2, dal gene Ciclina D, dal gene VEGF, dal gene EGFR, dal gene Ciclina A, dal gene Ciclina E, dal gene WNT-I, dal gene beta-catenina, dal gene c-MET, dal gene PKC, dal gene NFkB, dal gene STAT3, dal gene survivina, dal gene Her2/Neu, dal gene della topoisomerasi I, dal gene alfa della topoisomerasi II, dal gene p73,

M104.D1.SM.1DE

dal gene p21(WAF1/CIP1), dal gene p27(KIP1), dal gene PPM1D, dal gene RAS, dal gene caveolina I, dal gene MIB I, dal gene MTAI, dal gene M68, dal gene SORT1, dal gene XBPL, mutazione nei geni soppressori tumorali, dal gene soppressore tumorale p53, e loro combinazioni.

In un'altra forma di realizzazione, l'acido nucleico è un plasmide che codifica un polipeptide o una variante funzionale o un suo frammento, in modo tale che l'espressione del polipeptide o della variante funzionale o del suo frammento sia aumentata.

In un'ulteriore forma di realizzazione correlata, è descritto nella presente un metodo per trattare una malattia o un disturbo caratterizzato dalla sovraespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente il fornire al soggetto una particelle lipidica o composizione farmaceutica descritta qui, in cui l'agente terapeutico è selezionato tra un siRNA, un microRNA, un oligonucleotide antisense e un plasmide in grado di esprimere un siRNA, un microRNA o un oligonucleotide antisense, e in cui il siRNA, microRNA o RNA antisense comprende un polinucleotide che si lega in modo specifico a un polinucleotide che codifica il polipeptide o un suo complemento.

In un'altra forma di realizzazione correlata, è descritto qui un metodo di trattamento di una malattia o un disturbo caratterizzato dalla sottoespressione di un polipeptide in un soggetto comprendente fornire al soggetto la composizione farmaceutica descritta nella presente, in cui l'agente terapeutico è un plasmide che codifica il polipeptide o una sua variante funzionale o un suo frammento.

M104.D1.SM.1DE

In un'ulteriore forma di realizzazione, è descritto qui un metodo di induzione di una risposta immunitaria in un soggetto, comprendente fornire al soggetto una composizione farmaceutica descritta qui, in cui l'agente terapeutico è un oligonucleotide immunostimolatore. In particolari forme di realizzazione, la composizione farmaceutica è fornita al paziente in combinazione con un vaccino o un antigene.

In una forma di realizzazione correlata, è descritto qui un vaccino comprendente la particella lipidica descritta qui è un antigene associato a una malattia o a un patogeno. In una forma di realizzazione, la particella lipidica comprende un acido nucleico o un oligonucleotide immunostimolatore. In una particolare forma di realizzazione, l'antigene è un antigene tumorale. In un'altra forma di realizzazione, l'antigene è un antigene virale, un antigene batterico o un antigene parassitario.

Sono descritti qui inoltre metodi di preparazione di particelle lipidiche e di composizioni farmaceutiche descritte nella presente nonché kit utili nella preparazione di queste particelle lipidiche e composizioni farmaceutiche.

In un altro aspetto, è descritto qui un metodo di valutazione di una composizione che include un agente, ad esempio un agente terapeutico o agente diagnostico, e un lipide descritto qui.

Le figure mostrano:

La FIG. 1 è un grafico a barre che illustra l'effetto delle formulazioni lipidiche comprendenti DLin-M-C3-DMA sul

M104.D1.SM.1DE

silenziamento di FVII in un modello murino.

La FIG. 2 è un grafico a barre che illustra la risposta alla dose di MC3 in ratti con varie composizioni liposomiali.

La FIG. 3 è un grafico a barre che mostra la dipendenza da ApoE dell'efficacia di formulazioni comprendenti MC3. Topi di tipo selvaggio ma non knockout per ApoE hanno mostrato una riduzione dipendente dalla dose dei livelli della proteina FVII. La FIG. 2 illustra anche un grafico che dimostra che la dipendenza da ApoE della formulazione liposomiale di MC3 e la mancanza del silenziamento in topi ApoE KO con l'uso di MC3 può efficacemente essere salvaguardata mediante premiscelazione con ApoE.

La FIG. 4 è un grafico a barre che mostra gli effetti di variazioni della percentuale in mole di MC3 in una formulazione liposomiale e anche gli effetti di variazioni del lipide neutro (ad esempio, sostituendo il lipide neutro con DSPC, DMPC, e DLPC).

La FIG. 5 è un grafico a barre che mostra che l'aumento della schermatura di PEG diminuisce il silenziamento non-GalNAc-mediato nei topi.

La FIG. 6 è un grafico a barre che mostra che l'aumento della schermatura di PEG diminuisce il silenziamento non-GalNAc-mediato in ratti.

La FIG. 7 è un grafico a barre che mostra l'efficacia di formulazioni liposomiali aventi diverse % in mole di MC3, con e senza GalNAc.

M104.D1.SM.1DE

La FIG. 8 è un grafico a barre che mostra che l'attività di liposomi GALNAc-mirati è abolita in topi knockout per il recettore dell'Asialoglicoproteina (ASGPR).

La FIG. 9 è una curva dose-risposta della % residua di FVII e la dose (mg/kg) per la formulazione preparata nell'esempio 17.

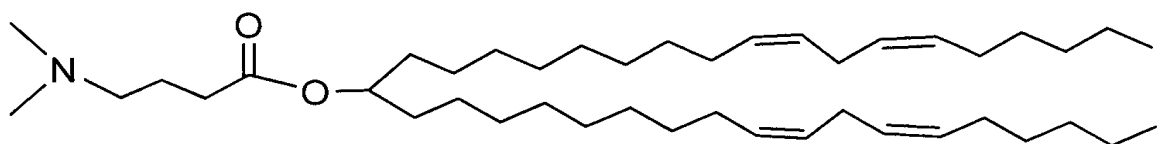
La FIG. 10 è una curva di titolazione di pKa di un lipide cationico di formula I come determinato nell'esempio 18.

Qui è descritta una formulazione lipidica migliorata che può essere usata, ad esempio, per rilasciare un agente, ad esempio, un agente a base di acido nucleico quale un costrutto a base di RNA a una cellula o a un soggetto. Sono anche descritti qui metodi di somministrazione di formulazioni lipidiche migliorate contenenti un costrutto a base di RNA a un animale e in alcune forme di realizzazione, la valutazione dell'espressione del gene bersaglio o target. In alcune forme di realizzazione, la formulazione lipidica migliorata include un lipide di bersagliamento (ad esempio, un lipide di bersagliamento descritto nella presente quale un lipide contenente GalNAc o folato).

LIPIDI

Sono descritte qui formulazioni lipidiche comprendenti un lipide cationico di formula I, un lipide neutro, uno sterolo e un lipide PEG o PEG-modificato, in cui

la formula I è



M104.D1.SM.1DE

In una forma di realizzazione, il lipide è una miscela racemica.

In una forma di realizzazione, il lipide è arricchito in un diastereomero, ad esempio, il lipide ha almeno 95%, almeno 90%, almeno 80%, o almeno 70% di eccesso diastereomerico.

In una forma di realizzazione, il lipide è puro a livello chirale, ad esempio è un singolo isomero.

In una forma di realizzazione, il lipide è arricchito per un isomero.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui sono intrappolate per almeno 75%, almeno 80%, o almeno 90%. in una forma di realizzazione, la formulazione include da circa 25% a circa 75% su base molare di lipide cationico di formula I ad esempio, da circa 35 a circa 65%, da circa 45 a circa 65%, circa 60%, circa 57,5%, circa 50% o circa 40% su base molare.

In una forma di realizzazione, la formulazione include da circa 0,5% a circa 15% su base molare di lipide neutro ad esempio, da circa 3 a circa 12%, da circa 5 a circa 10% o circa 15%, circa 10%, o circa 7,5% su base molare.

In una forma di realizzazione, la formulazione include da circa 5% a circa 50% su base molare dello sterolo (ad esempio, da circa 15 a circa 45%, da circa 20 a circa 40%, circa 40%, circa 38,5%, circa 35%, o circa 31% su base molare. In una forma di realizzazione, lo sterolo è colesterolo.

In una forma di realizzazione, la formulazione include da circa 0,5% a circa 20% su base molare del lipide PEG o PEG-modificato (ad

M104.D1.SM.1DE

esempio, da circa 0,5 a circa 10%, da circa 0,5 a circa 5%, circa 1,5%, circa 0,5%, circa 1,5%, circa 3,5%, o circa 5% su base molare.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono 25-75% del lipide cationico di formula I, 0,5-15% del lipide neutro, 5-50% dello sterolo, e 0,5-20% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare.

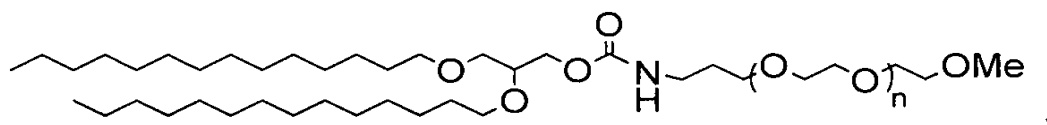
In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono 35-65% di lipide cationico di formula I, 3-12% del lipide neutro, 15-45% dello sterolo, e 0,5-10% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono 45-65% del lipide cationico di formula I, 5-10% del lipide neutro, 25-40% dello sterolo, e 0,5-10% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 60% del lipide cationico di formula I, circa 7,5% di lipide neutro, circa 31% dello sterolo, e circa 1,5% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo e il lipide PEG è PEG-DMG (indicato anche come PEG-C14 o C14-PEG). In una forma di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato comprende una molecola di PEG di un peso molecolare medio di 2.000 Da. In altre forme di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato comprende una molecola di PEG di un peso molecolare medio inferiore a 2.000, ad esempio

M104.D1.SM.1DE

intorno a 1.500 Da, intorno a 1.000 Da, o intorno a 500 Da. In una forma di realizzazione il lipide PEG o PEG modificato è un composto della seguente Formula VI:



con una molecola di PEG di un peso molecolare medio di 2.000 Da. In una forma di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato è PEG-distearoil glicerolo (PEG-DSG, indicato anche nella presente come PEG-C18 o C18-PEG).

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 50% del lipide cationico di formula I, circa 10% di lipide neutro, circa 38,5% di sterolo, e circa 1,5% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo e il lipide PEG PEG-DMG (indicato nella presente come PEG-C14 o C14-PEG). In una forma di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato è PEG-distiril glicerolo (PEG-DSG, indicato anche nella presente come PEG-C18 o C18-PEG). In una forma di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato è PEG-DPG (PEG-dipalmitoilglicerolo). In una forma di realizzazione, il lipide PEG o PEG modificato comprende una molecola di PEG di un peso molecolare medio di 2.000 Da.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 50% di lipide cationico di formula I, circa 10% di lipide neutro, circa 35% di sterolo, circa 4,5% del lipide PEG o PEG-

M104.D1.SM.1DE

modificato, e circa 0,5% di lipide di bersagliamento su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo, il lipide PEG è PEG-distearoil glicerolo (PEG-DSG, indicato anche come PEG-C18 o C18-PEG), e il lipide di bersagliamento è GalNAc3-PEG-DSG.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 50% del lipide cationico di formula I, circa 10% di lipide neutro, circa 35% di sterolo, circa 4,5% del lipide PEG o PEG-modificato, e circa 0,5% del lipide di bersagliamento su base molare. In una forma di realizzazione preferita il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo, il lipide PEG è PEG-DMG (indicato anche nella presente come PEG-C14 o C14-PEG).

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 40% di lipide cationico di formula I, circa 15% del lipide neutro, circa 40% dello sterolo, e circa 5% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo, il lipide PEG è PEG-DMG (indicato anche nella presente come PEG-C14 o C14-PEG).

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 50% di lipide cationico di formula I, circa 10% di lipide neutro, circa 35% dello sterolo, e circa 5% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione

M104.D1.SM.1DE

preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo, il lipide PEG è PEG-DMG (indicato anche nella presente come PEG-C14 o C14-PEG).

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 57,2% di lipide cationico di formula I, circa 7,1% del lipide neutro, circa 34,3% dello sterolo, e circa 1,4% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DPPC, lo sterolo è colesterolo, il lipide PEG è PEG-cDMA (PEG-cDMA è ulteriormente descritto in Heyes et al. (*J. Controlled Release*, 107, 276-287 (2005))).

In una forma di realizzazione, GalNAc3-PEG-DSG, il lipide PEG o PEG modificato è un composto di formula VI o PEG-DSG, in cui la molecola di PEG ha un peso molecolare medio di 2.000 Da.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui includono circa 57,5% del lipide cationico di formula I, circa 7,5% del lipide neutro, circa 31,5% di sterolo, e circa 3,5% del lipide PEG o PEG-modificato su base molare. In una forma di realizzazione preferita, il lipide cationico è il composto di formula I, il lipide neutro è DSPC, lo sterolo è colesterolo e il lipide PEG è PEG-DMG.

In una forma di realizzazione, il rapporto tra lipide:siRNA è almeno circa 0,5:1, almeno circa 1:1, almeno circa 2:1, almeno circa 3:1, almeno circa 4:1, almeno circa 5:1, almeno circa 6:1, almeno circa 7:1, almeno circa 8:1, almeno circa 10:1, almeno circa 11:1, almeno circa 12:1, a almeno circa 15:1. In una forma di

M104.D1.SM.1DE

realizzazione, il rapporto lipide:siRNA è tra circa 1:1 a circa 20:1, da circa 3:1 a circa 15:1, da circa 4:1 a circa 15:1, da circa 5:1 a circa 13:1. In una forma di realizzazione, il rapporto di lipide:siRNA è tra circa 0,5:1 a circa 15:1.

In un aspetto, la formulazione lipidica migliorata include anche un lipide di bersagliamento. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento include una frazione caratteristica GALNAc (ossia, una frazione caratteristica N-galattosamina). Ad esempio, un lipide di bersagliamento che comprende una frazione caratteristica GALNAc può includere quelli descritti in USSN 12/328.669, depositato il 12/4/2008. Un lipide di bersagliamento può anche includere qualsiasi altro lipide (ad esempio, lipide di bersagliamento) noto nella tecnica, ad esempio, come descritto in USSN 12/328.669, o nella pubblicazione internazionale n. WO 2008/042973. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento include una pluralità di frazioni caratteristiche GALNAc, ad esempio, due o tre frazioni caratteristiche GALNAc. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento contiene una pluralità, ad esempio, due o tre frazioni caratteristiche di N-acetilgalattosamina (GALNAc). In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è 1,2-Di-O-esadecil-*sn*-gliceride (ossia, DSG). In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento include una frazione caratteristica PEG (ad esempio, una frazione caratteristica PEG avente un peso molecolare di almeno circa 500 Da, come circa 1000 Da, 1500 Da, 2000 Da o più), ad esempio, la frazione caratteristica di bersagliamento è

M104.D1.SM.1DE

connessa al lipide tramite una frazione caratteristica PEG.

In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento include una frazione caratteristica folato. Ad esempio, un lipide di bersagliamento comprendente una frazione caratteristica folato può includere quelli descritti in USSN 12/328.669, depositato il 12/4/2008. In un'altra forma di realizzazione, un lipide di bersagliamento comprendente una frazione caratteristica folato può includere il composto di formula V.

Lipidi di bersagliamento esemplificativi sono rappresentati dalla formula L che segue:

(Gruppo di bersagliamento)_n-L-lipide formula L

in cui

il gruppo di bersagliamento è un gruppo di bersagliamento noto agli esperti nella tecnica e/o descritto nella presente (ad esempio, un recettore di superficie cellulare);

n è un numero intero da 1 a 5 (ad esempio, 3)

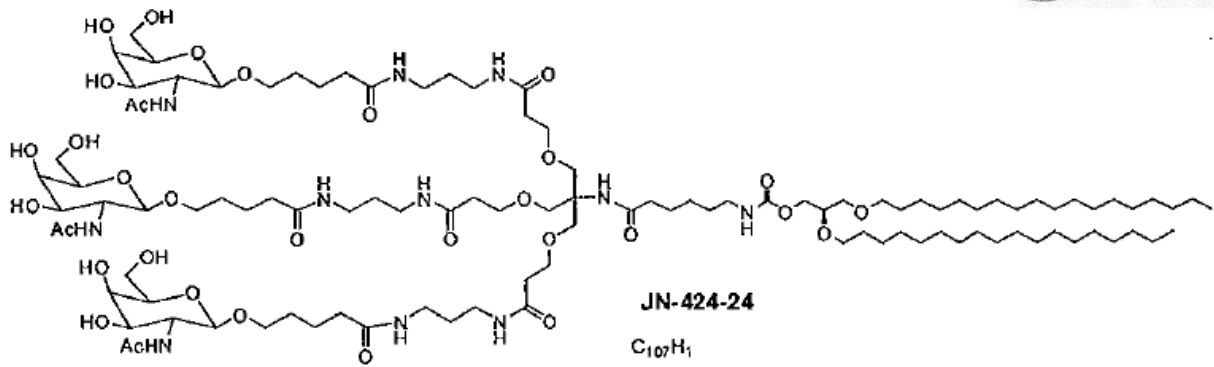
L è un gruppo di legame; e

il lipide è un lipide quale un lipide descritto nella presente (ad esempio, un lipide neutro quale DSG).

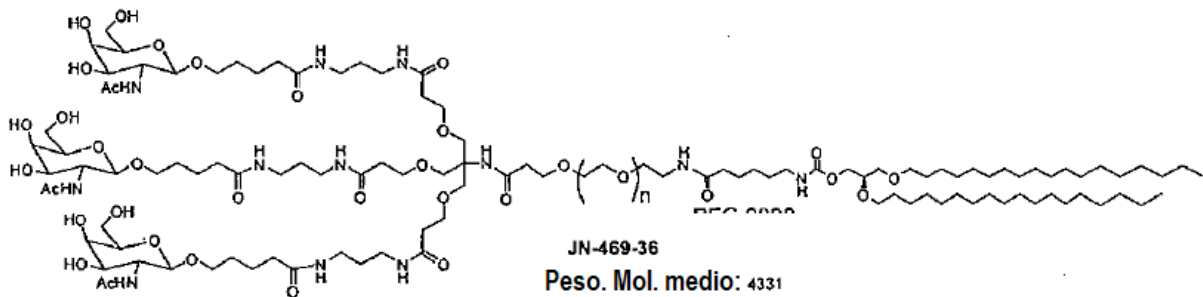
In alcune forme di realizzazione, il gruppo di legame include una frazione caratteristica PEG.

In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è il composto II, III, IV o V come fornito di seguito:

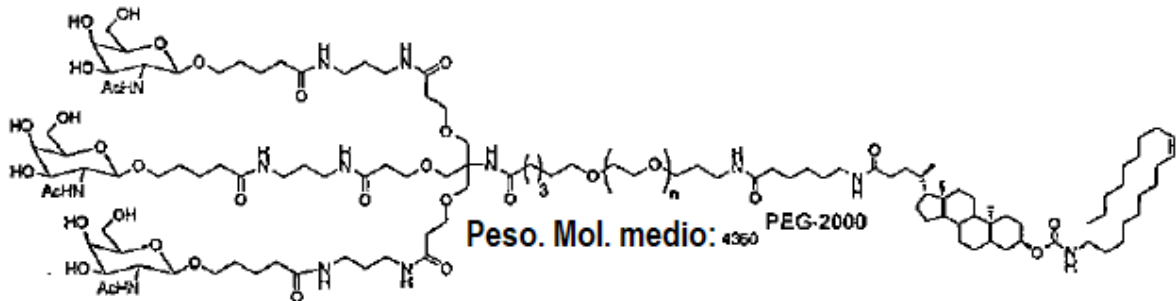
M104.D1.SM.1DE

**GalNAc3-DSG**

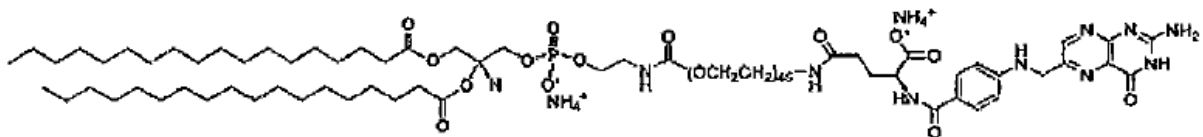
Formula II



Formula III

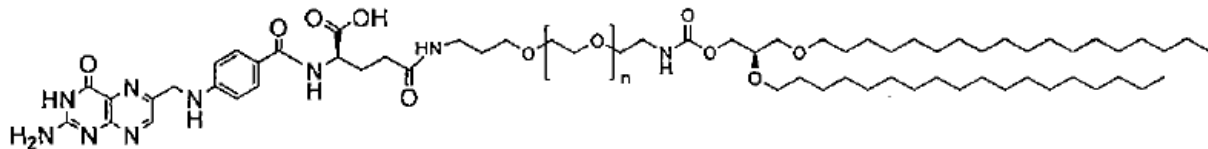
GalNAc3-PEG-DSG**(GalNAc)₃-PEG-LCO**

Formula IV

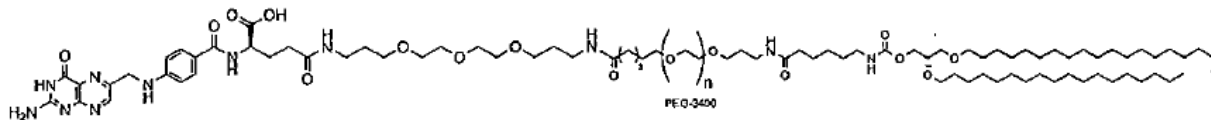
**Folato-PEG-DSPE**

1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato (poli-
etilen glicol)-2000] (sale di ammonio)

Formula V



Peso. Mol.: ~ 3028

Folato-PEG2000-DSG**Formula VI**

Peso. Mol.: ~ 4761

Folato-PEG3400-DSG**Formula VII**

In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è presente nella formulazione in una quantità da circa 0,001% a circa 5% (ad esempio, circa 0,005%, 0,15%, 0,3%, 0,5%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4%, o 5%) su base molare. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è presente nella formulazione in una quantità da circa 0,005% a circa 1,5%. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è incluso in una formulazione descritta nella presente.

In alcune forme di realizzazione la formulazione lipidica includeva anche un antiossidante (ad esempio, un catturatore o scavenger radicalico). L'antiossidante può essere presente nella formulazione, ad esempio, a una quantità da circa 0,01% a circa 5%. L'antiossidante può essere idrofobo o idrofilo (ad esempio, solubile in lipidi o solubile in acqua). In alcune forme di realizzazione, l'antiossidante è un composto fenolico, ad esempio, butilidrossitoluene, resveratrolo, coenzima Q10, o altri flavinoidi, o una

M104.D1.SM.1DE

vitamina, ad esempio, vitamina E o vitamina C. Altri ossidanti esemplificativi includono acido lipoico, acido urico, un carotene come betacarotene o retinolo (vitamina A), glutatione, melatonina, selenio e ubiquinolo.

In alcune forme di realizzazione, il recettore per il lipide di bersagliamento (ad esempio, un lipide contenente GALNAc) è il recettore dell'asialoglicoproteina (ossia, ASGPR).

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui sono prodotte attraverso un metodo di estrusione o un metodo di miscelazione in linea.

Il metodo di estrusione (indicato anche come metodo preformato o come processo a lotti) è un metodo in cui liposomi vuoti (ossia nessun acido nucleico) sono dapprima preparati, con successiva addizione di acido nucleico ai liposomi vuoti. L'estrusione di composizioni liposomiche tramite una membrana di policarbonato a piccoli pori o una membrana ceramica asimmetrica determina una distribuzione granulometrica relativamente ben definita. Tipicamente, la sospensione è ciclizzata attraverso la membrana una o più volte fino a quando si ottiene la distribuzione granulometrica del complesso liposomico desiderata. I liposomi possono essere estrusi attraverso membrane a pori successivamente più piccoli per ottenere una riduzione graduale della dimensione dei liposomi. In alcuni casi, le composizioni di lipide-acido nucleico che sono formate possono essere usate senza alcun dimensionamento. Questi metodi sono descritti in US 5.008.050; US 4.927.637; US 4.737-323; *Biochim*

M104.D1.SM.1DE

Biophys Acta. 19 Ottobre 1979; 557(1):9-23; *Biochim Biophys Acta.* 2 ottobre 1980;601(3):559-7; *Biochim Biophys Acta.* 13 giugno 1986; 858(1):161-8; e *Biochim. Biophys. Acta* 1985 812, 55-65.

Il metodo di miscelazione in linea è un metodo in cui sia i lipidi sia l'acido nucleico sono addizionati parallelamente in una camera di miscelazione. La camera di miscelazione può essere un semplice connettore a T o una qualsiasi altra camera di miscelazione nota a un esperto nella tecnica. Questi metodi sono descritti nei brevetti US n. 6.534.018 e US 6.855.277; pubblicazione US 2007/0042031 e *Pharmaceuticals Research*, Vol. 22, n. 3, marzo 2005, pagg. 362-372.

Inoltre è inteso che le formulazioni descritte qui possano essere preparate mediante qualsiasi metodo noto a un esperto ordinario nella tecnica.

In un'ulteriore forma di realizzazione, le formulazioni rappresentative comprendenti il composto di formula I, sono delineate nella Tabella 1.

Tabella 1

MC3	DSPC	Colesterolo	PEG
60	7.5	31	1.5
50	10	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
60	7.5	21	1.5
50	10	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
	20		
40	(DMPC)	38.5	1.5
30	30	38.5	1.5
	10		
50	(DMPC)	38.5	1.5
	30		
30	(DMPC)	38.5	1.5
	10		
51	(DLPC)	38.5	1.5
	20		
40	(DLPC)	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
40	10	40	10
60	10	20	10
40	20	37	3
60	10	27	3

In una forma di realizzazione, le formulazioni specifiche comprendenti il composto di formula I sono descritte come segue:

Rapporto di lipidi (in percentuale molare)

Rapporto lipide:siRNA

50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

Lipide:siRNA ~ 11

40/15/40/5 (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/35/4,5/0,5% (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DSG (C18-PEG):

GalNAc3-PEG-DSG)

M104.D1.SM.1DE

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/30/9,5/0,5% (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DSG: GalNAc3-
PEG-DSG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/35/5% (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DSG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/38,5/1,5 (MC3 : DPPC : colesterolo : PEG-DMG)

Lipide:siRNA ~ 11

40/15/40/5 (MC3 : DPPC : colesterolo : PEG-DMG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/35/4,5/0,5% (MC3 : DPPC : colesterolo : PEG-DSG: GalNAc3-
PEG-DSG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/30/9,5/0,5% (MC3 : DPPC : colesterolo : PEG-DSG: GalNAc3-
PEG-DSG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/35/5% (MC3 : DPPC : colesterolo : PEG-DSG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 11

50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

Lipide:siRNA ~ 7

50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DSG)

Lipide:siRNA ~ 10

50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

Lipide:siRNA ~ 12

50/10/35/5% (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

M104.D1.SM.1DE

Rapporto lipide:siRNA ~ 8

50/10/35/5% (MC3 : DSPC : colesterolo : PEG-DMG)

Rapporto lipide:siRNA ~ 10

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui sono intrappolate per almeno il 75%, almeno l'80%, o almeno il 90%.

In una forma di realizzazione, le formulazioni descritte qui comprendono inoltre una apolipoproteina. Come usata nella presente, il termine "apolipoproteina" o "lipoproteina" si riferisce ad apolipoproteine note agli esperti nella tecnica e loro varianti e loro frammenti e agonisti di apolipoproteine, loro analoghi o frammenti descritti di seguito.

Apolipoproteine adeguate includono senza limitazione, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V e ApoE, e forme polimorfe, isoforme attive, varianti e mutanti nonché loro frammenti o forme tronche. In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina è una apolipoproteina contenente tiolo. "Apolipoproteina contenente tiolo" si riferisce ad una apolipoproteina, variante, frammento o isoforma che contiene almeno un residuo cisteina. Le apolipoproteine contenenti tiolo più comuni sono ApoA-I Milano (ApoA-I_M) e ApoA-I Paris (ApoA-I_P) che contengono un residuo cisteina (Jia et al., 2002, Biochem. Biophys. Res. Comm. 297:206-13; Bielicki and Oda, 2002, Biochemistry 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 e ApoE3 sono anche apolipoproteine contenenti tiolo. ApoE isolate e/o suoi frammenti attivi e analoghi polipeptidici, inclusi loro forme prodotte in modo ricombinante sono descritti nei brevetti U.S. n. 5.672.685; 5.525.472; 5.473.039;

M104.D1.SM.1DE

5.182.364; 5.177.189; 5.168.045; 5.116.739. ApoE3 è descritta in Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms," J. Biol. Chem. (1981) 256: 9077-9083; e Rail, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E da type III hyperlipoproteinemic subjects," Proc. Nat. Acad. Sci. (1982) 79: 4696-4700. Si veda anche il numero di accesso GenBank K00396.

In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina può essere nella sua forma matura, nella sua forma preproapolipoproteina o nella sua forma proapolipoproteina. Omodimeri ed eterodimeri (laddove fattibile) di pro-ApoA-I e di ApoA-I matura (Duverger et al., 1996, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 16(12): 1424-29), ApoA-I Milano (Klon et al., 2000, Biophys. J. 79:(3)1679-87; Franceschini et al., 1985, J. Biol. Chem. 260: 1632-35), ApoA-I Paris (Daum et al., 1999, J. Mol. Med. 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, Euro. J. Biochem. 201(2):373-83), e ApoE (McLean et al., 1983, J. Biol. Chem. 258(14):8993-9000) possono anche essere utilizzati.

In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina può essere un frammento, una variante o una isoforma dell'apolipoproteina. Il termine "frammento" si riferisce a qualsiasi apolipoproteina avente una sequenza di amminoacidi più corta di quella di una apolipoproteina nativa e il cui frammento mantiene l'attività della

M104.D1.SM.1DE

apolipoproteina nativa incluse le proprietà di legame lipidico. Con "variante" si intendono sostituzioni o alterazioni delle sequenze di amminoacidi della apolipoproteina, le quali sostituzioni o alterazioni, ad esempio, addizioni e delezioni di residui amminoacidici, non aboliscono l'attività della apolipoproteina nativa, incluse le proprietà di legame lipidico. Pertanto, una variante può comprendere una proteina o un peptide avente una sequenza di amminoacidi sostanzialmente identica a una apolipoproteina nativa fornita nella presente in cui uno o più residui amminoacidici sono stati sostituiti in modo conservativo con amminoacidi chimicamente simili. Esempi di sostituzioni conservative includono la sostituzione di almeno un residuo idrofobo quale isoleucina, valina, leucina o metionina a un altro. Similmente, ad esempio, è contemplata la sostituzione di almeno un residuo idrofilo, come, ad esempio, tra arginine e lisina, tra glutammina e asparagina, e tra glicina e serina (si vedano i brevetti U.S. n. 6.004.925, 6.037.323 e 6.046.166). Il termine "isoforma" si riferisce a una proteina avente la stessa, maggiore o parziale funzione e sequenza simile, identica o parziale e può essere o meno il prodotto dello stesso gene e solitamente tessuto specifico (si vedano Weisgraber 1990, J. Lipid Res. 31(8): 1503-11; Hixson and Powers 1991, J. Lipid Res. 32(9): 1529-35; Lackner et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, J. Biol. Chem. 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.

M104.D1.SM.1DE

18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J. Clin. Invest. 101(8): 1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11): 1335-42; Draganov et al., 2000, J. Biol. Chem. 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, J. Lipid Res. 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, FEBS Lett. 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, Biophys. Chem. 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, J. Biol. Chem. 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(23): 14888-93 e brevetto U.S. n. 6.372.886).

In alcune forme di realizzazione, i metodi e le composizioni descritti qui includono l'uso di una costruzione chimerica di una apolipoproteina. Ad esempio, una costruzione chimerica di una apolipoproteina può essere costituita da un dominio apolipoproteina con elevata capacità di legame lipidico associato a un dominio di apolipoproteina contenente proprietà protettive della riperfusione di ischemia. Una costruzione chimerica di una apolipoproteina può essere una costruzione che include regioni separate all'interno di una apolipoproteina (ossia, costruzione omologa) o una costruzione chimerica può essere una costruzione che include regioni separate tra diverse apolipoproteine (ossia costruzioni eterologhe). Composizioni comprendenti una costruzione chimerica possono anche includere segmenti che sono varianti o segmenti di apolipoproteine progettate così da avere un carattere specifico (ad esempio, legame lipidico, legame recettoriale, proprietà enzimatica, attivante gli enzimi, un antiossidante o di ossido-riduzione) (si vedano Weisgraber 1990, J.

M104.D1.SM.1DE

Lipid Res. 31(8):1503-11; Hixson and Powers 1991, J. Lipid Res. 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, J. Biol. Chem. 260(2):703-6; Hoeg et al, 1986, J. Biol. Chem. 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, J. Biol. Chem. 259(1):468-74; Powell et al., 1987, Cell 50(6): 831-40; Aviram et al., 1998, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, J. Clin. Invest. 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, J. Biol. Chem. 275(43):33435-42; Steinmetz and Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, J. Biol. Chem. 255(21): 10464-71; Dyer et al., 1995, J. Lipid Res. 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, Arterioscler. Throb. Vase. Biol. 16(2):328-38; Thurberg et al., J. Biol. Chem. 271(11):6062-70; Dyer 1991, J. Biol. Chem. 266(23):150009-15; Hill 1998, J. Biol. Chem. 273(47): 30979-84).

Apolipoproteine usate qui includono anche apolipoproteine ricombinanti, sintetiche, semisintetiche o purificate. Metodi per ottenere apolipoproteine o loro equivalenti utilizzati qui sono ben noti nella tecnica. Ad esempio, apolipo-proteine possono essere separate da plasma o prodotti naturali ad esempio, mediante centrifugazione a gradiente di intensità o cromatografia di immunoaffinità o prodotti sinteticamente, semi-sinteticamente o usando tecniche a DNA ricombinante note agli esperti nell'arte (si veda, ad esempio, Mulugeta et al., 1998, J. Chromatogr. 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, J. Lipid Res. 21(3):284-91; Cheung et al.,

M104.D1.SM.1DE

1987, J. Lipid Res. 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, J. Chromatogr. 711:97-109; brevetti U.S. n. 5.059.528, 5.834.596, 5.876.968 e 5.721.114; e pubblicazioni PCT WO 86/04920 e WO 87/02062).

Le apolipoproteine utilizzate qui includono inoltre agonisti di apolipoproteine quali peptidi e analoghi peptidici che imitano l'attività di ApoA-I, ApoA-I Milano (ApoA-I_M), ApoA-I Paris (ApoA-I_P), ApoA-II, ApoA-IV, e ApoE. Ad esempio, l'apolipoproteina può essere una qualsiasi di quelle descritte nei brevetti U.S. n. 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166, e 5.840.688.

I peptidi agonisti di apolipoproteine o analoghi peptidici possono essere sintetizzati o prodotti usando qualsiasi tecnica per la sintesi peptidica nota nell'arte incluse, ad esempio, le tecniche descritte nei brevetti U.S. n. 6.004.925, 6.037.323 e 6.046.166. Ad esempio, i peptidi possono essere preparati usando la tecnica sintetica in fase solida inizialmente descritta da Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). Altre tecniche di sintesi peptidica possono essere trovate in Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2a Ed., (1976) e altri riferimenti già disponibili agli esperti nella tecnica. Un riepilogo di tecniche di sintesi polipeptidiche può essere trovato in Stuart and Young, Solid Phase Peptide. Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., (1984). I peptidi possono anche essere sintetizzati mediante metodi in soluzione come descritto in The Proteins, Vol. II, 3d Ed., Neurath et. al., Ed., pagg. 105-237, Academic Press, New York, N.Y. (1976).

M104.D1.SM.1DE

Gruppi protettivi adeguati per l'uso in diverse sintesi peptidiche sono descritti nei testi sopra citati nonché in McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, New York, N.Y. (1973). I peptidi descritti qui potrebbero anche essere preparati mediante cessione chimica enzimatica da porzioni più grandi di, ad esempio, apolipoproteina A-I.

In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina può essere una miscela di apolipoproteine. In una forma di realizzazione, l'apolipoproteina può essere una miscela omogenea, ossia un singolo tipo di apolipoproteina. In un'altra forma di realizzazione, l'apolipoproteina può essere una miscela eterogenea di apolipoproteine, ossia una miscela di due o più diverse apolipoproteine. Forme di realizzazione di miscele eterogenee di apolipoproteine possono comprendere, ad esempio, una miscela di una apolipoproteina da una fonte animale e una apolipoproteina da una fonte semisintetica. In alcune forme di realizzazione, una miscela eterogenea può comprendere, ad esempio, una miscela di ApoA-I e ApoA-I Milano. In alcune forme di realizzazione, una miscela eterogenea può comprendere, ad esempio, una miscela di ApoA-I Milano e ApoA-I Paris. Miscele adeguate per l'uso nei metodi e nelle composizioni descritti qui risulteranno evidenti agli esperti nella tecnica.

Se l'apolipoproteina è ottenuta da fonti naturali, essa può essere ottenuta da una fonte vegetale o animale. Se l'apolipoproteina è ottenuta da una fonte animale, l'apolipoproteina può essere di qualsiasi specie. In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina

M104.D1.SM.1DE

può essere ottenuta da una fonte animale. In alcune forme di realizzazione, l'apolipoproteina può essere ottenuta da una fonte umana. In forme di realizzazione preferite, l'apolipoproteina è derivata dalle stesse specie dell'individuo cui l'apolipoproteina è somministrata.

In una forma di realizzazione, il gene bersaglio è selezionato dal gruppo costituito da fattore VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gene beta PDGF, gene Erb-B, gene Src, gene CRK, gene GRB2, gene RAS, gene MEKK, gene JNK, gene RAF, gene Erk1/2, gene PCNA(p21), gene MYB, gene JUN, gene FOS, gene BCL-2, gene Ciclina D, gene VEGF, gene EGFR, gene Ciclina A, gene Ciclina E, gene WNT-1, gene beta-catenina, gene c-MET, gene PKC, gene NFkB, gene STAT3, gene survivina, gene Her2/Neu, gene della topoisomerasi I, gene dell'alfa topoisomerasi II, gene p73, gene p21(WAF1/CIP1), gene p27(KIP1), gene PPM1D, gene RAS, gene caveolina I, gene MIB I, gene MTAI, gene M68, mutazioni dei geni soppressori tumorali, gene soppressore tumorale p53, e loro combinazioni. In una forma di realizzazione, il gene bersaglio è un gene espresso nel fegato, ad esempio, il gene del fattore VII (FVII). L'effetto dell'espressione del gene bersaglio, ad esempio, FVII, è valutata misurando i livelli di FVII in un campione biologico quale un campione sierico o tissutale. Ad esempio, il livello di FVII, ad esempio, come misurato mediante il saggio dell'attività di FVII nel sangue può essere determinato. In una forma di realizzazione, il livello di mRNA nel fegato può essere valutato. In un'altra forma di realizzazione preferita, sono realizzate almeno

M104.D1.SM.1DE

due tipi di valutazione, ad esempio, una valutazione del livello di proteina (ad esempio, nel sangue), e una misura di un livello di mRNA (ad esempio, nel fegato) sono entrambi effettuate.

In una forma di realizzazione, l'agente è un acido nucleico, quale un RNA a doppio filamento (dsRNA).

In un'altra forma di realizzazione, l'agente di acido nucleico è un DNA o RNA a singolo filamento, o un DNA o RNA a doppio filamento, o DNA-RNA ibrido. Ad esempio, un DNA a doppio filamento può essere un gene strutturale, un gene comprendente regioni di controllo e terminazione o un sistema di autoreplicazione quale un DNA virale o plasmidico. Un RNA a doppio filamento può essere, ad esempio, dsRNA o un altro reagente RNA a interferenza. Un acido nucleico a singolo filamento può essere, ad esempio, un oligonucleotide antisense, ribozima, microRNA, o oligonucleotide formante triplex.

In ancora un'altra forma di realizzazione, a vari punti temporali dalla somministrazione di un agente candidato, un campione biologico quale un campione di fluido, ad esempio sangue, plasma o siero, o un campione tissutale, quale campione epatico, è prelevato dal soggetto di test e testato per un effetto dell'agente sui livelli di espressione della proteina o di mRNA bersaglio. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, l'agente candidato è dsRNA che mira FVII, e il campione biologico è testato per un effetto sui livelli della proteina fattore VII o mRNA. In una forma di realizzazione, i livelli plasmatici della proteina FVII sono testati, ad esempio, usando un saggio immunoistochimico o un saggio

M104.D1.SM.1DE

cromogenico. In un'altra forma di realizzazione, sono testati i livelli di mRNA di FVII nel fegato mediante un saggio come un saggio a DNA ramificato o un Northern blot o un saggio RT-PCR.

In una forma di realizzazione, l'agente, ad esempio, una composizione comprendente la formulazione lipidica migliorata, viene valutato per la tossicità. In un'ulteriore forma di realizzazione, il soggetto modello può essere monitorato per gli effetti fisici quali, ad esempio, una variazione di peso o di comportamento nella gabbia.

In una forma di realizzazione, il metodo comprende inoltre sottoporre l'agente, ad esempio, una composizione comprendente la formulazione lipidica migliorata a una ulteriore valutazione. L'ulteriore valutazione può includere, ad esempio, (i) una ripetizione della valutazione sopra descritta, (ii) una ripetizione della valutazione sopra descritta con diverso numero di animali o diverse dosi, o (iii) mediante un metodo diverso, ad esempio, valutazione di un altro modello animale, ad esempio, un primate non umano.

In un'altra forma di realizzazione è effettuata una decisione relativa al fatto di includere o meno l'agente e la formulazione lipidica migliorata in ulteriori studi quali una prova clinica, a seconda dell'effetto desiderato dell'agente candidato sui livelli proteici o di mRNA epatici. Ad esempio, se un dsRNA candidato è osservato diminuire i livelli proteici o mRNA di almeno 20%, 30%, 40%, 50% o più, allora l'agente può essere considerato per una prova clinica.

In un'ulteriore forma di realizzazione, si effettua una

M104.D1.SM.1DE

decisione relativamente al fatto di includere o meno l'agente e la formulazione lipidica migliorata in una composizione farmaceutica a seconda dell'effetto osservato dell'agente candidato e del lipide amminico sui livelli proteici o mRNA epatici. Ad esempio, se un dsRNA candidato è osservato diminuire livelli proteici o di mRNA di almeno 20%, 30%, 40%, 50%, o più, allora l'agente può essere considerato per una prova clinica.

In un ulteriore aspetto, qui è descritto un metodo di valutazione della formulazione lipidica migliorata per la sua adeguatezza al rilascio di un agente terapeutico in una cellula. In alcune forme di realizzazione è descritto qui un metodo per la valutazione della formulazione lipidica migliorata per la sua adeguatezza al rilascio di un costrutto a base di RNA, ad esempio, un dsRNA che mira FVII. Il metodo include fornire una composizione che include un dsRNA che mira FVII e un ammino lipide candidato, la somministrazione della composizione a un roditore, ad esempio, un topo, la valutazione dell'espressione di FVII in funzione di almeno uno tra il livello di FVII nel sangue e il livello di mRNA di FVII nel fegato valutando così l'ammino lipide candidato. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende inoltre il confronto dell'espressione del gene bersaglio con un valore di riferimento preselezionato.

Le composizioni che includono componenti contenenti lipidi, quale un liposoma, e gli stessi sono descritti in maggior dettaglio di seguito. Agenti a base di acido nucleico esemplificativi includono

M104.D1.SM.1DE

dsRNA, oligonucleotidi antisenso, ribozimi, microRNA, oligonucleotidi immunostimolatori, o oligonucleotidi formanti triplex. Questi agenti sono anche descritti in maggior dettaglio di seguito.

“Alchile” indica un idrocarburo alifatico saturo, non ciclico o ciclico, a catena lineare o ramificato contenente da 1 a 24 atomi di carbonio. Alchili a catena lineare saturi rappresentativi includono metile, etile, n-propile, n-butile, n-pentile, n-esile, e simili; mentre alchili ramificati saturi includono isopropile, sec-butile, isobutile, terz-butile, isopentile, e simili. Alchili ciclici saturi rappresentativi includono ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, e simili; mentre alchili ciclici insaturi includono ciclopentenile e cicloesenile, e simili.

“Alchenile” indica un alchile, come sopra definito, contenente almeno un doppio legame tra atomi di carbonio adiacenti. Alchenili includono sia isomeri cis sia isomeri trans. Alchenili a catena lineare e ramificati rappresentativi includono etilenile, propilenile, 1-butenile, 2-butenile, isobutilenile, 1-pentenile, 2-pentenile, 3-metil-1-butenile, 2-metil-2-butenile, 2,3-dimetil-2-butenile, e simili.

“Alchinile” indica qualsiasi alchile o alchenile, come sopra definito, che in aggiunta contiene almeno un triplo legame tra atomi di carbonio adiacenti. Alchinili a catena lineare e ramificati rappresentativi includono acetilenile, propinile, 1-butinile, 2-butinile, 1-pentinile, 2-pentinile, 3-metil-1 butinile, e simili.

“Acile” indica qualsiasi alchile, alchenile o alchinile in cui

M104.D1.SM.1DE

l'atomo di carbonio sul punto di attacco è sostituito con un gruppo osso, come definito di seguito. Ad esempio, $-C(=O)$ alchile, $-C(=O)$ alchenile, e $-C(=O)$ alchinile sono gruppi acile.

Il termine "arile" indica un sistema ciclico idrocarburico monociclico, biciclico o triciclico aromatico, in cui qualsiasi atomo nell'anello può essere sostituito. Esempi di frazioni caratteristiche arile includono, senza limitazione, fenile, naftile, antracenile e pirenele.

"Eterociclo" indica un anello eterociclico monociclico a 5-7 membri o biciclico a 7-10 membri che è saturo, insaturo o aromatico e che contiene 1 o 2 eteroatomi indipendentemente selezionati tra azoto, ossigeno e zolfo, e in cui gli eteroatomi di azoto e zolfo possono essere opzionalmente ossidati e l'eteroatomo di azoto può opzionalmente essere quaternizzato, inclusi anelli biciclici in cui uno qualsiasi dei suddetti eterocicli è fuso a un anello benzenico. L'eterociclico può essere attaccato attraverso qualsiasi eteroatomo o atomo di carbonio. Gli eterocicli includono eteroarili come sopra definito. Gli eterocicli includono morfolinile, pirrolidinone, pirrolidinile, piperidinile, piperizinile, idantoinile, valerolattamile, ossiranile, ossetanile, tetraidrofuranile, tetraidropiranile, tetraidropiridinile, tetraidroprimidinile, tetraidrotiofenile, te-traidrotiopiranile, tetraidropirimidinile, tetraidrotiofenile, te-traidrotiopiranile, e simili.

Le espressioni "alchile opzionalmente sostituito", "alchenile opzionalmente sostituito", "alchinile opzionalmente sostituito",

M104.D1.SM.1DE

"acile opzionalmente sostituito" e "eterociclo opzionalmente sostituito" indicano che quando sostituito, almeno un atomo di idrogeno è sostituito con un sostituente. Nel caso di un sostituente osso, (=O) due atomi di idrogeno sono sostituiti. A tal riguardo, sostituenti includono osso, alogeno, eterociclo, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x e -SO_nNR^xR^y, in cui n è 0, 1 o 2, R^x ed R^y sono uguali o diversi e indipendentemente idrogeno, alchile o eterociclo e ognuno di detti sostituenti alchile ed eterociclo può essere ulteriormente sostituito con uno o più tra osso, alogeno, -OH, -CN, alchile, -OR^x, eterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x e -SO_nNR^xR^y.

Il termine "eteroarile" si riferisce a un sistema ciclico monociclico a 5-8 membri, biciclico a 8-12 membri, o triciclico a 11-14 membri aromatici aventi 1-3 eteroatomi se monociclico, 1-6 eteroatomi se biciclico, o 1-9 eteroatomi se triciclico, detti eteroatomi selezionati tra O, N, o S (ad esempio, atomi di carbonio e 1-3, 1-6, o 1-9 eteroatomi di N, O, o S se monociclico, biciclico o triciclico, rispettivamente), in cui qualsiasi atomo nell'anello può essere sostituito. I gruppi eteroarile descritti nella presente possono anche contenere anelli fusi che condividono un legame carbonio-carbonio comune. Il termine "alchileterociclo" si riferisce a un eteroarile in cui almeno uno degli atomi nell'anello è sostituito con alchile, alchenile o alchinile.

Il termine "sostituito" si riferisce alla sostituzione di uno o

M104.D1.SM.1DE

più radicali idrogeno in una data struttura con il radicale di un sostituente specificato inclusi, senza limitazione: alo, alchile, alchenile, alchinile, arile, eterociclicile, tiolo, alchiltio, osso, tiossi, ariltio, alchiltioalchile, ariltioalchile, alchilsolfonile, alchilsolfonilalchile, arilsolfonilalchile, alcossi, arilossi, aralcossi, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, arilamminocarbonile, alcossicarbonile, arilossicarbonile, aloalchile, ammino, trifluorometile, ciano, nitro, alchilammino, arilammino, alchilamminoalchile, arilamminoalchile, amminoalchilammino, ossidrile, alcossialchile, carbossialchile, alcossicarbonilalchile, amminocarbonilalchile, acile, aralcossicarbonile, acido carbossilico, acido solfonico, solfonile, acido fosfonico, arile, eteroarile, eterociclico, e alifatico. È inteso che il sostituente può essere ulteriormente sostituito. "Alogeno" indica fluoro, cloro, bromo e iodio.

I termini "alchilammina" e "dialchilammina" si riferiscono a radicali $-NH(\text{alchile})$ e $-N(\text{alchil})_2$ rispettivamente.

Il termine "alchilfosfato" si riferisce a $-O-P(Q')(Q'')-O-R$, in cui Q' e Q'' sono ognuno indipendentemente O, S, $N(R)_2$, alchile o alcossi opzionalmente sostituito; ed R è alchile opzionalmente sostituito, ω -amminoalchile o ω -aminoalchile(sostituito).

Il termine "alchilfosforotioato" si riferisce a un alchilfosfato in cui almeno uno tra Q' o Q'' è S.

Il termine "alchilfosfonato" si riferisce a un alchilfosfato in cui almeno uno tra Q' o Q'' è alchile.

M104.D1.SM.1DE

Il termine "idrossialchile" indica radicale -O-alchile.

Il termine "alchileterociclo" si riferisce a un alchile in cui almeno un metilene è stato sostituito da un eterociclo.

Il termine " ω -amminoalchile" si riferisce a un radicale -alchil-NH₂. E il termine " ω -aminoalchile (sostituito)" si riferisce a un ω -amminoalchile in cui almeno uno tra H o N è stato sostituito con alchile.

Il termine " ω -fosfoalchile" si riferisce a -alchil-O-P(Q')(Q'')-O-R, in cui Q' e Q'' sono ognuno indipendentemente O o S ed R alchil opzionalmente sostituito.

Il termine " ω -tiofosfoalchile" si riferisce a ω -fosfoalchile in cui almeno uno tra Q' o Q'' è S.

In alcune forme di realizzazione, i metodi descritti quite possono richiedere l'uso di gruppi di protezione. La metodologia dei gruppi di protezione è ben nota agli esperti nella tecnica (*si veda, ad esempio, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999*). In breve, gruppi di protezione entro il contesto descritto qui sono qualsiasi gruppo che riduce o elimina la reattività indesiderata di un gruppo funzionale. Un gruppo di protezione può essere addizionato a un gruppo funzionale per mascherare la sua reattività durante alcune reazioni e quindi rimossa per rivelare il gruppo funzionale originale. In alcune forme di realizzazione, si usa un "gruppo di protezione alcol". Un "gruppo di protezione alcol" è qualsiasi gruppo che diminuisce o elimina la reattività indesiderata di un gruppo funzionale alcol. Gruppi di

M104.D1.SM.1DE

protezione possono essere addizionati e rimossi usando tecniche ben note nell'arte.

Particelle lipidiche

Gli agenti e/o gli ammino lipidi per l'analisi nel modello di screening epatico caratterizzato nella presente possono essere formulati in particelle lipidiche. Le particelle lipidiche includono, senza limitazione, liposomi. Come usato nella presente, un liposoma è una struttura avente membrane contenenti lipidi che racchiudono un interno acquoso. Liposomi possono avere uno o più membrane lipidiche. Entrambi i liposomi a singolo strato che sono indicati come liposomi unilamellari e multistrato, che sono indicati come multilamellari sono contemplati. Quando complessate con acidi nucleici le particelle lipidiche possono anche essere lipocomplessi, che sono costituiti da bistrati lipidici cationici interposti tra strati di DNA come descritto, ad esempio, in Felgner, *Scientific American*.

Le particelle lipidiche possono inoltre includere uno o più lipidi aggiuntivi e/o altri componenti quali colesterolo. Altri lipidi possono essere inclusi nelle composizioni liposomiali per una varietà di scopi, quali prevenire l'ossidazione lipidica o per attaccare ligandi sulla superficie liposomiale. Uno qualsiasi dei lipidi può essere presente inclusi lipidi anfipatici, neutri, cationici, e anionici. Tali lipidi possono essere usati da soli o in combinazione. Esempi specifici di componenti lipidici aggiuntivi che possono essere presenti sono descritti di seguito.

Componenti aggiuntivi che possono essere presenti in una

M104.D1.SM.1DE

particella lipidica includono componenti stabilizzanti bistrato quali oligomeri poliammidici (si veda, ad esempio, il brevetto U.S. n. 6.320.017), peptidi, proteine, detergenti, derivati lipidici, quali PEG accoppiati a fosfatidiletanolamina e PEG coniugati a ceramidi (si veda, il brevetto U.S. n. 5.885.613). In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica include un agente di bersagliamento quale un lipide di bersagliamento descritto nella presente.

Una particella lipidica può includere uno o più tra un secondo ammino lipide o lipide cationico, un lipide neutro, uno sterolo, e un lipide selezionato per ridurre l'aggregazione di particelle lipidiche durante la formazione che possono derivare dalla stabilizzazione sterica di particelle che previene l'aggregazione indotta da carica durante la formazione.

Come usato nella presente l'espressione "lipide cationico" intende includere lipidi che hanno una o due catene di acido grasso o alchile grasso e un gruppo di testa amminico (inclusi un gruppo alchilammino o dialchilammino) che possono essere protonati così da formare un lipide cationico a pH fisiologico. In alcune forme di realizzazione, un lipide cationico è indicato come "ammino lipide".

Altri lipidi cationici includerebbero quelli derivati da gruppi di acido grasso alternativi e altri gruppi di alchilammino, inclusi quelli in cui i sostituenti alchile sono diversi (ad esempio, N-etil-N-metilammino-, N-propil-N-etilammino- e simili). In generale, i lipidi (ad esempio, lipide cationico) aventi meno catene acile sature

M104.D1.SM.1DE

sono più facilmente dimensionati, in particolare quando i complessi sono dimensionati al di sotto di circa 0,3 micron, a scopi di sterilizzazione con filtro. I lipidi cationici contenenti acidi grassi insaturi con lunghezze della catena di carbonio nell'intervallo da C₁₀ a C₂₀ sono preferiti. Altre impalcature possono anche essere usate per separare il gruppo amminico (ad esempio, il gruppo amminico del lipide cationico) e l'acido grasso o la porzione alchile di acido grasso del lipide cationico. Impalcature adeguate sono note agli esperti nella tecnica.

In alcune forme di realizzazione, i lipidi cationici hanno almeno un gruppo protonabile o deprotonabile, in modo tale che il lipide sia caricato positivamente a un pH fisiologico o al di sotto del pH fisiologico (ad esempio, pH 7,4) e neutro a un secondo pH, preferibilmente a un pH fisiologico o al di sopra del pH fisiologico. Tali lipidi sono anche indicati come lipidi cationici. Ovviamente si comprenderà che l'addizione o la rimozione di protoni in funzione del pH è un processo in equilibrio e che il riferimento a un lipide caricato o neutro si riferisce alla natura della specie predominante e non richiede che tutto il lipide sia presente nella forma carica o neutra. I lipidi che hanno più di un gruppo protonabile o deprotonabile o che sono zwitterionici non sono esclusi quite.

In alcune forme di realizzazione, i lipidi protonabili (ossia, i lipidi cationici) hanno una pKa del gruppo protonabile nell'intervallo da circa 4 a circa 11. Massimamente preferita è una pKa da circa 4 a circa 7 poiché questi lipidi saranno cationici a uno

M104.D1.SM.1DE

stadio di formulazione a pH inferiore, mentre le particelle saranno ampiamente (se non completamente) neutralizzate in superficie a pH fisiologico intorno a pH 7,4. Uno dei benefici di questa pKa è che almeno parte dell'acido nucleico associato alla superficie esterna della particella perderà la sua interazione elettrostatica a pH fisiologico e sarà rimosso mediante semplice dialisi riducendo pertanto la suscettibilità della particella alla clearance.

Esempi di lipidi che riducono l'aggregazione di particelle durante la formazione includono lipidi modificati da polietilen glicole (PEG), monosialoganglioside Gm1, e oligomeri poliammidici ("PAO") come (descritto nel brevetto U.S. n. 6.320.017). Altri composti con frazioni caratteristiche non cariche, idrofile, di barriera sterica, che prevengono l'aggregazione durante la formulazione, quali PEG, Gm1 o ATTA, possono anche essere accoppiati a lipidi per uso nei metodi e nelle composizioni descritti qui. Lipidi ATTA sono descritti, ad esempio, nel brevetto U.S. n. 6.320.017, e i coniugati PEG-lipidi sono descritti, ad esempio, nei brevetti U.S. n. 5.820.873, 5.534.499 e 5.885.613. Tipicamente, la concentrazione del componente lipidico selezionato per ridurre l'aggregazione è da circa 1 a 15% (percento in mole di lipidi).

Esempi di lipidi che riducono l'aggregazione e/o sono adatti per la coniugazione ad agenti di acido nucleico che possono essere usati nel modello di screening epatico sono lipidi modificati da polietilen glicole (PEG) monosialoganglioside Gm1, e gli oligomeri poliammidici ("PAO") come (descritto nel brevetto U.S. n. 6.320.017). Altri

M104.D1.SM.1DE

composti con frazioni caratteristiche non cariche, idrofile, di barriera sterica, che prevengono l'aggregazione durante la formulazione, quali PEG, Gm1 o ATTA, possono anche essere accoppiati a lipidi per uso nei metodi e nelle composizioni descritti qui. Lipidi ATTA sono descritti, ad esempio, nel brevetto U.S. n. 6.320.017, e i coniugati PEG-lipidi sono descritti, ad esempio, nei brevetti U.S. n. 5.820.873, 5.534.499 e 5.885.613. Tipicamente, la concentrazione del componente lipidico selezionato per ridurre l'aggregazione è da circa 1 a 15% (per cento in mole di lipidi).

Esempi specifici di lipidi PEG-modificati (o coniugati lipid-poliossietilene) che sono utili qui, possono avere una varietà di porzioni lipidiche di "ancoraggio" per assicurare la porzione PEG sulla superficie della vescicola lipidica. Esempi di lipidi PEG-modificati includono fosfatidiletanolamina PEG-modificata e acido fosfatidico, coniugati PEG-ceramide (ad esempio, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) che sono descritti in USSN 08/486.214 co-pendente, dialchilammine PEG-modificate e 1,2-diacilossipropan-3-ammine PEG-modificate. Sono particolarmente preferiti diacilgliceroli e dialchilgliceroli PEG-modificati. In alcune forme di realizzazione, la % in mole totale di lipidi PEG all'interno di una particella è di circa 1,5% in mole. Ad esempio, quando la particella include una pluralità di lipidi PEG descritti nella presente quali il lipide PEG-modificato come sopra descritto e il lipide di bersagliamento contenente un PEG, la quantità totale dei lipidi contenenti PEG

M104.D1.SM.1DE

quando considerati insieme è di circa 1,5% in mole.

In forme di realizzazione in cui una frazione caratteristica stericamente grande quale PEG o ATTA è coniugata a un'ancora lipidica, la selezione dell'ancora lipidica dipende dal tipo di associazione che il coniugato deve avere con la particella lipidica. È ben noto che mePEG (mw2000)-diastearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) rimarrà associata a un liposoma fino a quando la particella è rimossa dalla circolazione, possibilmente alcuni giorni. Altri coniugati, quali EG-CerC20 hanno capacità di permanenza simile. PEG-CerC14, tuttavia, rapidamente fuoriesce dalla formulazione in seguito ad esposizione a siero, con un $T_{1/2}$ inferiore a 60 minuti, in molti saggi. Come illustrato nella domanda di brevetto US SN 08/486.214, almeno tre caratteristiche influenzano la velocità di scambio: lunghezza della catena acile, saturazione della catena acile, e dimensione del gruppo di testa di barriera sterico. I composti aventi variazioni adeguate di queste caratteristiche possono essere utili qui. Per alcune applicazioni terapeutiche può essere preferibile che il lipide PEG-modificato sia perso rapidamente dalla particella acido nucleico-lipide *in vivo* e pertanto il lipide PEG-modificato possiederà ancora lipidiche relativamente corte. In altre applicazioni terapeutiche, può essere preferibile che la particella acido nucleico-lipide presenti una durata nella circolazione plasmatica più lunga e pertanto il lipide PEG-modificato possiederà ancora lipidiche relativamente più lunghe. Ancore lipidiche esemplificative includono quelle aventi lunghezze da circa C_{14} a circa

M104.D1.SM.1DE

C₂₂, preferibilmente da circa C₁₄ a circa C₁₆. In alcune forme di realizzazione, una frazione caratteristica PEG, ad esempio, un mPEG-NH₂, ha una dimensione di circa 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 dalton.

Si dovrebbe notare che composti che prevengono l'aggregazione non richiedono necessariamente coniugazione lipidica per funzionare adeguatamente. PEG libero o ATTA libero in soluzione possono essere sufficienti a prevenire l'aggregazione. Se le particelle sono stabili dopo la formulazione, il PEG o ATTA può essere dializzato prima della somministrazione a un soggetto.

Lipidi neutri, quando presenti nella particella lipidica possono essere uno qualsiasi di una serie di specie lipidiche che esistono in forma zwitterionica non carica o neutra a pH fisiologico. Tali lipidi includono, ad esempio, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramide, sfingomieline, diidrosfingomieline, cefalina e cerebrosidi. La selezione di lipidi neutri per l'uso nelle particelle descritte nella presente è generalmente guidata dalla considerazione di, ad esempio, della dimensione liposomiale e della stabilità dei liposomi nella circolazione sanguigna. Preferibilmente, il componente lipidico neutro è un lipide avente due gruppi acile, (ossia, diacilfosfatidilcolina e diacilfosfatidiletanolamina). Lipidi aventi una varietà di gruppi della catena acile di varie lunghezze della catena e grado di saturazione sono disponibili o possono essere isolati o sintetizzati mediante tecniche ben note. In un gruppo di forme di realizzazione, lipidi contenenti acidi grassi

M104.D1.SM.1DE

saturi con lunghezza della catena carboniosa nell'intervallo da C₁₄ a C₂₂ sono preferiti. In un altro gruppo di forme di realizzazione, lipidi con acidi grassi mono o diinsaturi con lunghezze della catena carboniosa nell'intervallo da C₁₄ a C₂₂, sono usati. In aggiunta, lipidi aventi miscele di catene di acidi grassi sature e insature possono essere usati. Preferibilmente, i lipidi neutri usati nella presente sono DOPE, DSPC, DPPC, POPC, o qualsiasi fosfatidilcolina affine. I lipidi neutri utili nella presente possono anche essere costituiti da sfingomieline, diidrosfingomieline, o fosfolipidi con altri gruppi di testa, quali serina e inositolo.

Il componente sterolo della miscela lipidica, quando presente, può essere uno qualsiasi degli steroli convenzionalmente usati nel campo della preparazione di liposoma, vescicola lipidica o particella lipidica. Uno sterolo preferito è il colesterolo.

Altri lipidi cationici, che portano una carica positiva netta all'incirca pH fisiologico, oltre a quelli sopra descritti in modo specifico, possono anche essere inclusi nelle particelle lipidiche descritte qui. Tali lipidi cationici includono, senza limitazione, N,N-dioleil-N,N-dimetilammonio cloruro ("DODAC"); N-(2,3-dioleilossi)propil-N,N,N-trietilammonio cloruro ("DOTMA"); N,N-distearil-N,N-dimetilammonio bromuro ("DDAB"); N-(2,3-dioleilossi)propil)-N,N,N-trimetilammonio cloruro ("DOTAP"); sale di 1,2-dioleilossi-3-trimetilamminopropan cloruro ("DOTAP.Cl"); 3β-(N-(N',N'-dimetilamminoetan)-carbammioil)colesterolo ("DC-Chol"), N-(1-(2,3-dioleilossi)propil)-N-2-(spermincarbossammido)etil)-N,N-dimetilammonio

M104.D1.SM.1DE

trifluoracetato ("DOSPA"), diottadecilammidoglicil carbossipermina ("DOGS"), 1,2-dioleoil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleoil-3-dimetilammonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleilossi)-propilamina ("DODMA"), e N-(1,2-dimiristilossi)prop-3-il)-N,N-dimetil-N-idrossietil ammonio bromuro ("DMRIE"). In aggiunta, una serie di preparazioni commerciali di lipidi cationici può essere usata, come ad esempio, LIPOFECTIN (inclusi DOTMA e DOPE, disponibili da GIBCO/BRL), e LIPOFECTAMINE (inclusi DOSPA e DOPE, disponibili da GIBCO/BRL). In particolari forme di realizzazione, un lipide cationico è un ammino lipide.

Lipidi anionici adeguati per uso nelle particelle lipidiche descritte qui includono, senza limitazione, fosfatidilglicerolo, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, acido diacilfosfatidico, N-dodecanoil fosfatidiletanolamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutaril fosfatidiletanolamina, lisil-fosfatidilglicerolo e altri gruppi modificanti anionici uniti a lipidi neutri.

In numerose forme di realizzazione, lipidi anfipatici sono inclusi in particelle lipidiche descritte qui. "Lipidi anfipatici" si riferiscono a qualsiasi materiale adeguato in cui la porzione idrofoba del materiale lipidico si orienta in una fase idrofoba mentre la porzione idrofila si orienta verso la fase acquosa. Tali composti includono, senza limitazione, fosfolipidi, amminolipidi, e sfingolipidi. Fosfolipidi rappresentativi includono sfingomieline, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositolo, acido fosfatidico, palmitoiloleoil

M104.D1.SM.1DE

fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), o dilinoleoilfosfatidilcolina (DLPC). Altri composti privi di fosforo, quali sfingolipidi, famiglie di glicosfindolipidi, diacilgliceroli e β -acilossiacidi possono anche essere usate. In aggiunta, tali lipidi anfipatici possono essere facilmente miscelati con altri lipidi, quali trigliceridi e steroli.

Lipidi di fusione programmabile sono anche adeguati per l'inclusione nelle particelle lipidiche descritte qui. Tali particelle lipidiche hanno scarsa tendenza a fondersi con membrane cellulari e rilasciare il loro carico utile fino a quando si verifica un evento di segnale dato. Ciò consente alla particella lipidica di distribuirsi più uniformemente dopo l'iniezione in un organismo o sito di malattia prima che inizi a fondersi con le cellule. L'evento segnale può essere, ad esempio, una variazione di pH, temperatura, ambiente ionico o tempo. Nell'ultimo caso, un ritardo di fusione o componente di "cloaking", quale un coniugato ATTA-lipide o un coniugato PEG-lipide, può essere semplicemente sostituito fuori dalla membrana della particella lipidica nel tempo. Ancore lipidiche esemplificative includono quelle aventi lunghezze da circa C₁₄ a circa C₂₂, preferibilmente da circa C₁₄ a circa C₁₆. In alcune forme di realizzazione, una frazione caratteristica PEG, ad esempio mPEG-NH₂, ha una dimensione di circa 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 dalton.

M104.D1.SM.1DE

Nel momento in cui la particella lipidica è adeguatamente distribuita nell'organismo, essa ha perso sufficiente agente di cloaking così da essere fusogena. Con altri eventi di segnale, è auspicabile selezionare un segnale che è associato a un sito di malattia o cellula bersaglio, come la temperatura aumentata su un sito di infiammazione.

Una particella lipidica coniugata a un agente di acido nucleico può anche includere una frazione caratteristica di bersagliamento, ad esempio, una frazione caratteristica di bersagliamento che è specifica per un tipo cellulare o tessuto. Il bersagliamento di particelle lipidiche usando una varietà di frazioni caratteristiche di bersagliamento, quali ligandi, recettori della superficie cellulare, glicoproteine, vitamine (ad esempio, riboflavina) e anticorpi monoclonali, è stato precedentemente descritto (si vedano, ad esempio, i brevetti U.S. n. 4.957.773 e 4.603.044). Frazioni caratteristiche di bersagliamento esemplificative includono un lipide di bersagliamento quale un lipide di bersagliamento descritto nella presente. In alcune forme di realizzazione, il lipide di bersagliamento è un GalNAc contenente il lipide di bersagliamento quale GalNAc3-DSG e GalNAc3-PEG-DSG come descritto nella presente. Le frazioni caratteristiche di bersagliamento possono includere l'intera proteina o un suo frammento. I meccanismi di bersagliamento generalmente richiedono che gli agenti di bersagliamento siano posizionati sulla superficie della particella lipidica in modo tale che la frazione caratteristica di bersagliamento sia disponibile per

M104.D1.SM.1DE

l'intera azione con il bersaglio, ad esempio, un recettore della superficie cellulare. Una varietà di diversi agenti e metodi di bersagliamento sono noti e disponibili nella tecnica, inclusi quelli descritti, ad esempio, in Sapra, P. and Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); e Abra, RM et al, *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

L'uso di particelle lipidiche (ossia, liposomi, con un rivestimento superficiale di catene polimeriche idrofile, quali catene di polietilen glicole (PEG) per il bersagliamento è stato proposto (Allen, et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al, *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klivanov, et al, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); brevetto U.S. n. 5.013556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4:296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353:71-74 (1994); Zalipsky, in *Stealth Liposomes Capitolo 9* (Lasic and Martin, Ed) CRC Press, Boca Raton Fl (1995). In un approccio, un ligando quale un anticorpo per il bersagliamento della particella lipidica è legato al gruppo di testa polare di lipidi formanti la particella lipidica. In un altro approccio, il ligando di bersagliamento è attaccato alle estremità distali delle catene di PEG formanti il rivestimento polimerico idrofilo (Klivanov, et al, *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Metodi standard per l'accoppiamento di agenti bersaglio possono essere usati. Ad esempio, fosfatidiletanolamina, che può essere attivata per l'attacco di agenti bersaglio o composti lipofili

M104.D1.SM.1DE

derivatizzati, quali bleomicina lipide-derivatizzata, possono essere usati. Liposomi con anticorpo bersaglio possono essere costruiti usando, ad esempio, liposomi che incorporano proteina A (si vedano, Renneisen, *et al*, *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) e Leonetti, *et al*, *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 87:2448-2451 (1990). Altri esempi di coniugazione anticorpale sono descritti nel brevetto U.S. n. 6.027.726. Esempi di frazioni caratteristiche di bersagliamento possono anche includere altre proteine, specifiche per i componenti cellulari, inclusi antigeni associati a neoplasmi o tumori. Le proteine usate come frazioni caratteristiche di bersagliamento possono essere attaccate ai liposomi tramite legami covalenti (si veda, Heath, *Covalent Attachment of Proteins a Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Altri metodi di bersagliamento includono il sistema biotina-avidina.

In una forma di realizzazione esemplificativa, la particella lipidica comprende una miscela del lipide cationico descritto qui, lipidi neutri (diversi da un lipide cationico), uno sterolo (ad esempio, colesterolo) e un lipide PEG-modificato (ad esempio, un PEG-DMG o PEG-cDMA). In alcune forme di realizzazione, la miscela lipidica consiste o consiste sostanzialmente nel lipide cationico descritto qui, un lipide neutro, colesterolo e un lipide PEG-modificato. In ulteriori forme di realizzazione preferite, la particella lipidica consiste in o consiste sostanzialmente nella miscela lipidica suddetta in rapporti molari da circa 20 a 70% DLin-M-C3-DMA:5-45% lipide neutro:20-55% colesterolo:0,5-15% lipide PEG-

M104.D1.SM.1DE

modificato.

In forme di realizzazione particolari, la particella lipidica consiste o consiste sostanzialmente di DLin-M-C3-DMA, DSPC, Chol, e o PEG-DMG o PEG-cDMA, ad esempio, in un rapporto molare di circa 20-60% DLin-M-C3-DMA:5-25% DSPC:25-55% Col:0,5-15% PEG-DMG o PEG-cDMA. In particolari forme di realizzazione, il rapporto lipidico molare è all'incirca 40/10/40/10 (% in mole DLin-M-C3-DMA /DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA), 35/15/40/10 (% in mole DLin-M-C3-DMA /DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA) o 52/13/30/5 (% in mole DLin-M-C3-DMA /DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA).

In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide neutro, DSPC, in queste composizioni è sostituito con POPC, DPPC, DOPE o SM.

Composizioni e formulazioni di agente terapeutico-particella lipidica

Sono descritte qui composizioni comprendenti una particella lipidica descritta nella presente e un principio attivo in cui il principio attivo è associato alla particella lipidica. In particolari forme di realizzazione, il principio attivo è un agente terapeutico. In particolari forme di realizzazione, il principio attivo è incapsulato all'interno di una parte interna acquosa della particella lipidica. In altre forme di realizzazione, il principio attivo è presente all'interno di uno o più strati lipidici della particella lipidica. In altre forme di realizzazione, il principio attivo è legato alla superficie lipidica esterna o interna di una particella lipidica.

“Completamente incapsulato” come usato nella presente indica che

M104.D1.SM.1DE

l'acido nucleico nelle particelle non è significativamente degradato dopo esposizione a siero o a un saggio di nucleasi che degraderebbe in modo notevole il DNA libero. In un sistema completamente incapsulato, preferibilmente meno del 25% in peso dell'acido nucleico particellare è degradato in un trattamento che normalmente degraderebbe il 100% dell'acido nucleico libero, più preferibilmente meno del 10% e in modo massimamente preferibile almeno del 5% dell'acido nucleico particellare è degradato. In alternativa, la completa incapsulazione può essere determinata da un saggio Oligreen®. Oligreen® è una colorazione di acido nucleico fluorescente ultrasensibile per quantificare oligonucleotidi e DNA a singolo filamento in soluzione (disponibile da Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Completamente incapsulato indica anche che le particelle sono stabili nel siero, ossia non si decompongono rapidamente nelle loro parti componenti in seguito alla somministrazione *in vivo*.

Principi attivi, come usati nella presente, includono qualsiasi molecola o composto in grado di esercitare un effetto desiderato su una cellula, tessuto, organo o soggetto. Tali effetti possono essere biologici, fisiologici, o cosmetici, ad esempio. Principi attivi possono essere di qualsiasi tipo di molecola o composti inclusi, ad esempio, acidi nucleici, peptidi e polipeptidi, inclusi, ad esempio, anticorpi, quali ad esempio, anticorpi policlonali, anticorpi monoclonali, frammenti anticorpali; anticorpi umanizzati, anticorpi ricombinanti, anticorpi umani ricombinanti e anticorpi Primatized™,

M104.D1.SM.1DE

citochine, fattori di crescita, fattori apoptotici, fattori di induzione della differenziazione, recettori di superficie cellulare e loro ligandi; ormoni; e piccole molecole, incluse piccole molecole organiche o composti organici.

In una forma di realizzazione, il principio attivo è un agente terapeutico o un sale o un suo derivato. I derivati di agenti terapeutici possono essere di per sé terapeuticamente attivi o possono essere profarmaci, che diventano attivi in seguito a ulteriore modificazione. Pertanto, in una forma di realizzazione, un derivato di agente terapeutico mantiene parte di o tutta l'attività terapeutica rispetto all'agente non modificato, mentre in un'altra forma di realizzazione, un derivato di agente terapeutico è privo di attività terapeutica.

In varie forme di realizzazione, gli agenti terapeutici includono qualsiasi agente o farmaco terapeuticamente efficace, quali composti antinfiammatori, antidepressivi, stimolanti, analgesici, antibiotici, farmaci per il controllo delle nascite, antipiretici, vasodilatatori, anti-angiogenici, agenti citovascolari, inibitori della trasduzione del segnale, farmaci cardiovascolari, ad esempio, agenti anti-aritmici, vasocostrittori, ormoni e steroidi.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico è un farmaco oncologico, che può anche essere indicato come farmaco antitumorale, farmaco anticancro, farmaco tumorale, un agente antineoplastico, o simili. Esempi di farmaci oncologici che possono essere usati includono, senza limitazione, adriamicina, alcheran,

M104.D1.SM.1DE

allopurinolo, altretamina, amifostina, anastrozolo, araC, triossido di arsenico, azatioprina, bexarotene, biCNU, bleomicina, busulfan endovenoso, busulfan orale, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucil, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, citosina arabinoside, daunorubicina, Citoxan, daunorubicina, desametasone, dexrazossano, dodetaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, etoposide fosfato, etoposide e VP-16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracile, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumab-ozogamicina, goserelina acetato, idrea, idrossiurea, idarubicina, ifosfamide, imatinib mesilato, interferone, irinotecan (Camptostar, CPT-111), letrozolo, leucovorina, leustatina, leuprolide, levamisolo, litretinoina, megastrol, melfalan, L-PAM, mesna, metotrexato, metossalen, mitramicina, mitomicina, mitoxantrone, mostarda azotata, paclitaxel, pamidronato, Pegademase, pentostatina, porfimer sodico, prednisone, rituxan, streptozocina, STI-571, tamoxifen, taxotere, temozolamide, teniposide, VM-26, topotecan (icamtin), toremifene, tretinoina, ATRA, valrubicina, velban, vinblastina, vincristina, VP 16, e vinorelbina. Altri esempi di farmaci oncologici che possono essere usati sono ellipticina e analoghi o derivati della ellipticina, eptiloni, inibitori della chinasi intracellulare e camptotecine.

Particelle acido nucleico-lipide

In alcune forme di realizzazione, le particelle lipidiche descritte qui sono associate a un acido nucleico, determinando un

M104.D1.SM.1DE

acido nucleico-particella lipidica. In particolari forme di realizzazione, l'acido nucleico è completamente incapsulato nella particella lipidica. Come usata qui, l'espressione "acido nucleico" intende includere qualsiasi oligonucleotide o polinucleotide. Frammenti contenenti fino a 50 nucleotidi sono generalmente denominati oligonucleotidi, e frammenti più lunghi sono denominati polinucleotidi. In particolari forme di realizzazione, gli oligonucleotidi descritti nella presente hanno una lunghezza di 20-50 nucleotidi.

Nel contesto della presente invenzione, i termini "polinucleotide" e "oligonucleotide" si riferiscono a un polimero o oligomero di monomeri nucleotidici o nucleosidici che consistono in basi naturali, zuccheri e legami interzucchero (scheletro). I termini "polinucleotide" e "oligonucleotide" includono anche polimeri o oligomeri comprendenti monomeri non naturali o loro porzioni che funzionano similmente. Tali oligonucleotidi modificati sostituiti sono spesso preferiti rispetto a forme native a causa di proprietà quali, ad esempio, assorbimento cellulare potenziato e stabilità aumentata in presenza di nucleasi.

Gli oligonucleotidi sono classificati come deossiribo-oligonucleotidi o ribo-oligonucleotidi. Un deossiribo-oligonucleotide consiste in uno zucchero a 5 atomi di carbonio denominato deossiribosio unito in modo covalente a fosfato sugli atomi di carbonio 5' e 3' di questo zucchero per formare un polimero alternato non ramificato. Un ribo-oligonucleotide consiste in una struttura di ripetizione

M104.D1.SM.1DE

simile in cui lo zucchero con 5 atomi di carbonio è ribosio.

L'acido nucleico che è presente in una particella lipide-acido nucleico descritta qui, include qualsiasi forma di acido nucleico che è nota. Gli acidi nucleici usati qui possono essere DNA o RNA a singolo filamento, o DNA o RNA a doppio filamento, o ibridi di DNA-RNA. Esempi di DNA a doppio filamento includono geni strutturali, geni che includono regioni di controllo e di terminazione, sistemi autoreplicanti quali DNA virale o plasmidico. Esempi di RNA a doppio filamento includono siRNA e altri reagenti RNA interferenza. Acidi nucleici a singolo filamento includono ad esempio, oligonucleotidi antisenso, ribozimi, microRNA e oligonucleotidi formanti triplex.

Gli acidi nucleici descritti qui possono essere di varie lunghezze, in generale a seconda della forma particolare dell'acido nucleico. Ad esempio, in particolari forme di realizzazione, i plasmidi o geni possono avere una lunghezza da circa 1000 a 100.000 residui nucleotidici. In particolari forme di realizzazione, gli oligonucleotidi possono variare da circa 10 a 100 nucleotidi di lunghezza. In varie forme di realizzazione affini, gli oligonucleotidi, sia a singolo filamento, doppio filamento o triplo filamento possono variare di lunghezza da circa 10 a circa 50 nucleotidi, da circa 20 a circa 50 nucleotidi, da circa 15 a circa 30 nucleotidi, da circa 20 a circa 30 nucleotidi di lunghezza.

In particolari forme di realizzazione, un oligonucleotide (o un suo filamento) descritto qui ibrida in particolare con o è complementare a un polinucleotide bersaglio. "Ibridabile in modo

M104.D1.SM.1DE

specifico" e "complementare" sono termini che sono usati per indicare un grado sufficiente di complementarità, in modo che avvenga un legame stabile e specifico tra il bersaglio di DNA o RNA e l'oligonucleotide. Si intende che un oligonucleotide non deve essere necessariamente complementare al 100% con la sua sequenza di acido nucleico bersaglio per essere ibridabile in modo specifico. Un oligonucleotide è ibridabile in modo specifico quando legame dell'oligonucleotide al bersaglio o target interferisce con la funzione normale della molecola bersaglio per determinare una perdita di utilità o di espressione da esso e vi è un grado sufficiente di complementarità così da evitare il legame non specifico dell'oligonucleotide alle sequenze non-bersaglio in condizioni in cui è desiderato il legame specifico, ossia, in condizioni fisiologiche nel caso di un saggio in vivo o trattamento terapeutico o, come nel caso di saggi *in vitro*, in condizioni in cui sono eseguiti i saggi. Pertanto, in altre forme di realizzazione, questo oligonucleotide include 1, 2, o 3 sostituzioni di basi rispetto alla regione di un gene o sequenza di mRNA a cui è indirizzato o con cui ibrida in modo specifico.

Acidi nucleici RNA interferenza

In particolari forme di realizzazione, particelle acido nucleico-lipide descritte qui sono associate a molecole di RNA interferenza (RNAi). I metodi con RNA interferenza che usano molecole di RNAi possono essere usati per distruggere l'espressione di un gene o polinucleotide di interesse. Negli ultimi 5 anni, piccolo RNA

M104.D1.SM.1DE

interferente (siRNA) ha sostanzialmente sostituito ODN antisenso e ribozimi come nuova generazione di farmaci oligo-nucleotidi bersaglio in sviluppo. Gli siRNA sono duplex di RNA con la lunghezza normalmente di 21-30 nucleotidi che possono associarsi con un complesso multiproteine citoplasmico noto come complesso di silenziamento indotto da RNAi (RISC). RISC caricato con siRNA media la degradazione di trascritti di mRNA omologhi, pertanto siRNA può essere progettato per abbattere l'espressione proteica con alta specificità. Diversamente da altre tecnologie antisenso, siRNA funziona tramite un meccanismo naturale che si è evoluto per controllare l'espressione genica attraverso RNA non codificante. Questo è generalmente considerata la ragione per cui la loro attività è più potente *in vitro* e *in vivo* rispetto a ODN antisenso o ribozimi. Una varietà di reagenti RNAi, inclusi siRNA che sono indirizzati a bersagli clinicamente rilevanti sono attualmente in fase di sviluppo farmaceutico, come descritto, ad esempio, in de Fougerolles, A. *et al.*, Nature Reviews 6:443-453 (2007).

Sebbene le prime molecole di RNAi descritte fossero ibridi di RNA: RNA comprendenti sia RNA a filamento senso sia RNA a filamento antisenso, si è ora dimostrato che ibridi di DNA senso:RNA antisenso, ibridi di RNA senso:DNA antisenso, e ibridi di DNA:DNA sono in grado di mediare RNAi (Lamberton, J.S. e Christian, A.T., (2003) Molecular Biotechnology 24:111-119). Pertanto, qui è incluso l'uso di molecole di RNAi comprendenti uno qualsiasi di questi diversi tipi di molecole a doppio filamento. Inoltre, si intende che le molecole di RNAi

M104.D1.SM.1DE

possono essere usate e introdotte in cellule in una varietà di forme. Di conseguenza, come usata qui, molecole di RNAi comprendono una qualsiasi e tutte le molecole in grado di indurre una risposta di RNAi nelle cellule, inclusi, senza limitazione, polinucleotidi a doppio filamento comprendenti due filamenti separati, ossia un filamento senso e un filamento antisenso, ad esempio, piccolo RNA interferente (siRNA); polinucleotidi comprendenti un'ansa forcina di sequenze complementari che formano una regione a doppio filamento, ad esempio, molecole di shRNAi e vettori di espressione che esprimono uno o più polinucleotidi in grado di formare un polinucleotide a doppio filamento da solo o in combinazione con un altro polinucleotide.

“Composto di siRNA a singolo filamento” come usato qui, è un composto di siRNA che è costituito da una singola molecola. Esso può includere una regione duplex formata con appaiamento intrafilamento, ad esempio, può essere o includere una struttura a forcina o a manico. Composti di siRNA a singolo filamento possono essere antisenso relativamente alla molecola bersaglio.

Un composto di siRNA a singolo filamento può essere sufficientemente lungo affinché possa entrare nel RISC e partecipare nella scissione mediata da RISC di un mRNA bersaglio. Un composto di siRNA a singolo filamento ha una lunghezza di almeno 14, e in altre forme di realizzazione almeno 15, 20, 25, 29, 35, 40, o 50 nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, ha una lunghezza inferiore a 200, 100, o 60 nucleotidi.

M104.D1.SM.1DE

I composti di siRNA a forcina avranno una regione duplex pari a o almeno di 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 coppie nucleotidiche. La regione duplex può essere uguale a o inferiore a 200, 100, o 50, di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, gli intervalli per la regione duplex sono di 15-30, da 17 a 23, da 19 a 23, e da 19 a 21 coppie nucleotidiche di lunghezza. La forcina può avere una singola sporgenza di filamento o una regione non appaiata terminale. In alcune forme di realizzazione, le sporgenze sono lunghe 2-3 nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, la sporgenza è sul lato senso della forcina e in alcune forme di realizzazione, sul lato antisenso della forcina.

Un "composto di siRNA a doppio filamento" come usato qui, è un composto di siRNA che include più di uno, e in alcuni casi due filamenti in cui l'ibridazione intercatena può formare una regione di struttura duplex.

Il filamento antisenso di un composto di siRNA a doppio filamento può essere uguale a o di almeno, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, o 60 nucleotidi di lunghezza. Esso può essere uguale a o inferiore a 200, 100, o 50, nucleotidi di lunghezza. Intervalli possono essere da 17 a 25, da 19 a 23, e da 19 a 21 nucleotidi di lunghezza. Come usato qui, l'espressione "filamento antisenso" indica il filamento di un composto di siRNA che è sufficientemente complementare con una molecola bersaglio, ad esempio un RNA bersaglio.

Il filamento senso di un composto di siRNA a doppio filamento

M104.D1.SM.1DE

può essere uguale a o almeno 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, o 60 nucleotidi di lunghezza. Esso può essere uguale a o meno di 200, 100, o 50, nucleotidi di lunghezza. Intervalli possono essere da 17 a 25, da 19 a 23, e da 19 a 21 nucleotidi di lunghezza.

La porzione doppio filamento di un composto di siRNA a doppio filamento può essere pari a o di almeno, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40, o 60 coppie nucleotidiche di lunghezza. Essa può essere pari a o inferiore a 200, 100, o 50, coppie nucleotidiche di lunghezza. Intervalli possono essere di 15-30, da 17 a 23, da 19 a 23, e da 19 a 21 coppie nucleotidiche di lunghezza.

In molte forme di realizzazione, il composto siRNA è sufficientemente ampio affinché possa essere scisso da una molecola endogena, ad esempio, da Dicer, per produrre composti di siRNA più piccoli, ad esempio, agenti di siRNA.

I filamenti senso e antisense possono essere selezionati in modo tale che il composto di siRNA a doppio filamento includa una regione a singolo filamento o non appaiata su una o entrambe le estremità della molecola. Pertanto, un composto di siRNA a doppio filamento può contenere filamenti senso e antisense appaiati per contenere una sporgenza, ad esempio, una o due sporgenze in 5' o 3', o una sporgenza in 3' di 1-3 nucleotidi. Le sporgenze possono essere il risultato di un filamento più lungo dell'altro o il risultato di due filamenti della stessa lunghezza sfalsati. Alcune forme di realizzazione avranno almeno una sporgenza in 3'. In alcune forme di realizzazione, entrambe le estremità di una molecola di siRNA avranno

M104.D1.SM.1DE

una sporgenza in 3'. In alcune forme di realizzazione, la sporgenza è di 2 nucleotidi.

In alcune forme di realizzazione, la lunghezza della regione duplex è tra 15 e 30, o 18, 19, 20, 21, 22, e 23 nucleotidi di lunghezza, ad esempio, nell'intervallo del composto di ssiRNA sopra descritto. I composti di ssiRNA possono assomigliare in termini di lunghezza e struttura ai prodotti processati dalla Dicer naturale di dsRNA lunghi. Forme di realizzazione in cui i due filamenti del composto di ssiRNA sono legati, ad esempio, legati in modo covalente sono anche inclusi. Le strutture a forcina o altre strutture a singolo filamento che forniscono la regione a doppio filamento necessaria e la sporgenza in 3' rientrano anche nell'invenzione.

I composti di siRNA descritti qui, includono composti di siRNA a doppio filamento e composti di siRNA a singolo filamento possono mediare il silenziamento di un RNA bersaglio, ad esempio, mRNA, ad esempio, un trascritto di un gene che codifica una proteina. Per comodità, tale mRNA è anche indicato qui come mRNA da silenziare. Pertanto, un gene è anche indicato come un gene bersaglio. In generale, RNA da silenziare è un gene endogeno o un gene patogeno. Inoltre, RNA diverso da mRNA, ad esempio, tRNA, ed RNA virali, possono anche essere mirati.

Come descritto qui, la frase "media RNAi" si riferisce alla capacità di silenziare in un modo sequenza-specifico, un RNA bersaglio. Sebbene non si voglia essere vincolati dalla teoria, si ritiene che il silenziamento usi il macchinario o processo di RNAi e

M104.D1.SM.1DE

un RNA guida, ad esempio, un composto di siRNA di 21-23 nucleotidi.

In una forma di realizzazione, un composto di siRNA è "sufficientemente complementare" a un RNA bersaglio, ad esempio, un mRNA bersaglio, in modo tale che il composto di siRNA silenzi la produzione di proteina codificata dall'mRNA bersaglio. In un'altra forma di realizzazione, il composto di siRNA è "esattamente complementare" a un RNA bersaglio, ad esempio, l'RNA bersaglio e il composto di siRNA si riassociano, ad esempio, per formare un ibrido costituito esclusivamente dalle coppie di basi di Watson-Crick nella regione di esatta complementarietà. Un RNA bersaglio "sufficientemente complementare" può includere una regione interna (ad esempio, di almeno 10 nucleotidi) che è esattamente complementare a un RNA bersaglio. Inoltre, in alcune forme di realizzazione, il composto di siRNA discrimina in modo specifico una differenza di singolo-nucleotide. In questo caso, il composto di siRNA media soltanto RNAi se si trova complementarietà esatta nella regione (ad esempio, entro 7 nucleotidi di) differenza di singolo-nucleotide.

L'RNA interferenza (RNAi) può essere usato per inibire in modo specifico l'espressione di polinucleotidi bersaglio. La soppressione mediata da RNA a doppio filamento dell'espressione genica e di acido nucleico può essere ottenuta introducendo dsRNA, siRNA o shRNA in cellule o organismi. SiRNA può essere RNA a doppio filamento, o una molecola ibrida comprendente sia RNA sia DNA, ad esempio, un filamento di RNA e un filamento di DNA. È stato dimostrato che l'introduzione diretta di siRNA in una cellula può innescare RNAi in

M104.D1.SM.1DE

cellule di mammifero (Elshabir, S. M., et al. Nature 411:494-498 (2001)). Inoltre, la soppressione in cellule di mammifero si è verificata a livello dell'RNA ed era specifica per i geni bersaglio con una forte correlazione tra RNA e soppressione proteica (Caplen, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9746-9747 (2001)). Inoltre, si è mostrato che l'ampia varietà di linee cellulari, incluse HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 e cellule MCF-7 era suscettibile a un certo livello di silenziamento di siRNA (Brown, D. et al. TechNotes 9(1):1-7, disponibile sul web presso www.dot.ambion.dot.com/techlib/tn/91/912.html (9/1/02)).

Molecole di RNAi che mirano polinucleotidi specifici possono essere facilmente preparate secondo le procedure note nella tecnica. Caratteristiche strutturali di molecole di siRNA efficaci sono state identificate. Elshabir, S.M. et al. (2001) Nature 411:494-498 e Elshabir, S.M. et al. (2001), EMBO 20:6877-6888. Di conseguenza, un esperto nella tecnica capirebbe che un'ampia varietà di diverse molecole di siRNA può essere usata per mirare un gene o trascritto specifico. In alcune forme di realizzazione, le molecole di siRNA secondo l'invenzione sono a doppio filamento e di una lunghezza di 16-30 o 18-25 nucleotidi, incluso ogni numero intero nel mezzo. In una forma di realizzazione, un siRNA ha una lunghezza di 21 nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, siRNA hanno sporgenze di 0-7 nucleotidi in 3' o sporgenze di 0-4 nucleotidi in 5'. In una forma di realizzazione, una molecola di siRNA ha una sporgenza di due nucleotidi in 3'. In una forma di realizzazione, un siRNA ha una

M104.D1.SM.1DE

lunghezza di 21 nucleotidi con sporgenze di due nucleotidi in 3' (ossia, possono contenere una regione complementare di 19 nucleotidi tra i filamenti senso e antisenso). In alcune forme di realizzazione, le sporgenze sono sporgenze in 3' UU o dTdT.

In generale, molecole di siRNA sono completamente complementari a un filamento di una molecola di DNA bersaglio in quanto anche appaiamenti errati di una singola coppia di basi sono risultati ridurre il silenziamento. In altre forme di realizzazione, siRNA può avere una composizione dello scheletro modificata, ad esempio, modificazioni 2'-deossi- o 2'-O-metile. Tuttavia, in forme di realizzazione preferite, l'intero filamento di siRNA non è costituito da basi 2'-deossi o 2'-O-modificate.

In un'altra forma di realizzazione, è descritta qui una cellula comprendente un vettore per inibire l'espressione di un gene in una cellula. Il vettore include una sequenza regolatrice funzionalmente legata a una sequenza nucleotidica che codifica almeno un filamento di uno dei dsRNA descritti qui.

In una forma di realizzazione, i siti di bersaglio di siRNA sono selezionati scansionando la sequenza del trascritto di mRNA bersaglio per l'occorrenza di sequenze di dinucleotidi AA. Ogni sequenza di dinucleotidi AA in combinazione con 19 nucleotidi approssimativamente adiacenti in 3' sono potenziali siti bersaglio di siRNA. In una forma di realizzazione, siti bersaglio di siRNA sono preferibilmente non situati all'interno delle regioni non tradotte in 5' e 3' (UTR) o regioni vicine al codone di inizio (all'interno di circa 75 basi),

M104.D1.SM.1DE

poiché le proteine che si legano a regioni regolatrici possono interferire con il legame del complesso dell'endonucleasi siRNP (Elshabir, S. *et al.* Nature 411:494-498 (2001); Elshabir, S. *et al.* EMBO J. 20:6877-6888 (2001)). Inoltre, potenziali siti bersaglio possono essere confrontati a una banca dati genomica adeguata quale BLASTN 2.0.5, disponibile sul server NCBI presso www.ncbi.nlm, e potenziali sequenze bersaglio con notevole omologia con altre sequenze codificanti eliminate.

In particolari forme di realizzazione, RNA a forcina corti costituiscono il componente acido nucleico delle particelle acido nucleico-lipide descritti qui. L'RNA a forcina corto (shRNA) è una forma di RNA a forcina in grado di ridurre in modo sequenza-specifico l'espressione di un gene bersaglio. RNA a forcina corti possono offrire un vantaggio rispetto a siRNA nel sopprimere l'espressione genica in quanto sono generalmente più stabili e meno suscettibili alla degradazione nell'ambiente cellulare. Si è determinato che un tale silenziamento genico mediato da RNA a forcina corto opera in una varietà di linee di cellule normali e cancerose e in cellule di mammifero incluse cellule murine e umane. Paddison, P. *et al.*, Genes Dev. 16(8):948-58 (2002). Inoltre, linee di cellule transgeniche che portano geni cromosomiali che codificano per shRNA ingegnerizzato sono state generate. Queste cellule sono in grado di sintetizzare in modo costitutivo shRNA, facilitando così il silenziamento genico di lunga durata o costitutivo che può essere trasferito su cellule di progenie. Paddison, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(3):

M104.D1.SM.1DE

1443-1448 (2002).

ShRNA contengono la struttura a stelo ed ansa. In alcune forme di realizzazione, essi possono contenere lunghezze dello stelo variabile, tipicamente con una lunghezza da 19 a 29 nucleotidi o qualsiasi numero nel mezzo. In alcune forme di realizzazione, le forcine contengono steli da 19 a 21 nucleotidi, mentre in altre forme di realizzazione, le forcine contengono steli da 27 a 29 nucleotidi. In alcune forme di realizzazione, la dimensione dell'ansa è tra 4 e 23 nucleotidi di lunghezza, sebbene la dimensione dell'ansa possa essere superiore a 23 nucleotidi senza influenzare in modo significativo l'attività di silenziamento. Le molecole di shRNA possono contenere appaiamenti errati, ad esempio, appaiamenti errati G-U tra due filamenti dello stelo di shRNA senza diminuire la potenza. Infatti, in alcune forme di realizzazione, shRNA sono progettati così da includere uno o parecchie appaiamenti G-U nello stelo della forcina per stabilizzare le forcine durante la propagazione in batteri, ad esempio. Tuttavia, la complementarità tra la porzione dello stelo che si lega a mRNA bersaglio (filamento antisenso) ed mRNA è tipicamente richiesto, e anche un appaiamento errato di una singola coppia di basi nella regione può abolire il silenziamento. Sporgenze in 5' e 3' non sono richieste, in quanto non sembrano essere critiche per la funzione di shRNA, sebbene possono essere presenti (Paddison *et al.* (2002) *Genes & Dev.* 16(8):948-58).

MicroRNA

I microRNA (miRNA) sono una classe altamente conservata di

M104.D1.SM.1DE

piccole molecole di RNA che sono trascritte da DNA nei genomi di piante e animali, tuttavia non sono tradotte in proteina. miRNA processati sono molecole di RNA a ~17-25 nucleotidi (nt) a singolo filamento che vengono incorporate nel complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC) e sono stati identificate come i regolatori chiave di sviluppo, di proliferazione cellulare, di apoptosi e differenziazione. Essi sono considerati svolgere un ruolo nella regolazione dell'espressione genica mediante legame alla regione non traslata in 3' di mRNA specifici. RISC media la modulazione negativa dell'espressione genica attraverso l'inibizione traduzionale, la scissione del trascritto o entrambe. RISC è anche coinvolto nel silenziamento trascrizionale nel nucleo di un'ampia gamma di eucarioti.

Il numero di sequenze di miRNA identificato finora è ampio e in crescita, di cui esempi illustrativi possono essere trovati, ad esempio, in: "*miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, pubblicazione banca dati, D140-D144; "*The microRNA Registry*" Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, pubblicazione banca dati, D109-D111; e anche sul web presso microrna dot sanger dot ac dot uk/sequences/.

Oligonucleotidi antisenso

In una forma di realizzazione, un acido nucleico è un oligonucleotide antisenso diretto verso un polinucleotide bersaglio. L'espressione "oligonucleotide antisenso" o semplicemente "antisenso" intende includere oligonucleotidi che sono complementari a una

M104.D1.SM.1DE

sequenza polinucleotidica bersaglio. Oligonucleotidi antisenso sono singoli filamenti di DNA o RNA che sono complementari a una sequenza selezionata. Nel caso di RNA antisenso essi provengono la traduzione di filamenti di RNA complementare mediante legame allo stesso. DNA antisenso può essere usato per mirare un RNA complementare specifico (codificante o non codificante). Se il legame si verifica, questo ibrido di DNA/RNA può essere degradato dall'enzima RNasi H. In una particolare forma di realizzazione, oligonucleotidi antisenso contengono da circa 10 a circa 50 nucleotidi, più preferibilmente da circa 15 a circa 30 nucleotidi. Il termine comprende anche oligonucleotidi antisenso che possono non essere esattamente complementari al gene bersaglio desiderato. Pertanto, l'invenzione può essere utilizzata in casi in cui attività non bersaglio-specifica si trovano con antisenso o in cui una sequenza antisenso contenente uno o più appaiamenti errati con la sequenza bersaglio è massimamente preferita per un particolare uso.

Oligonucleotidi antisenso sono risultati inibitori efficaci e bersagli della sintesi proteica e di conseguenza, possono essere usati per inibire in modo specifico la sintesi proteica con un gene bersaglio. L'efficacia di oligonucleotidi antisenso per l'inibizione della sintesi proteica è ben stabilita. Ad esempio, la sintesi di poligalatturonasi e del recettore 2 acetilcolina del tipo muscarinico sono inibiti da oligonucleotidi antisenso diretti verso le rispettive sequenze di mRNA (brevetti U.S. 5.739.119 e U.S. 5.759.829). Inoltre, esempi dell'inibizione antisenso sono stati dimostrati con la

M104.D1.SM.1DE

proteina nucleare ciclina, il gene della resistenza multifarmaco (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, recettore GABA_A striatale ed EGF umano (Jaskulski *et al.*, Science. 10 giugno 1988; 240(4858):1544-6; Vasanthakumar and Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1(4):225-32; Peris *et al.*, Brain Res Mol Brain Res. 15 giugno 1998; 57(2):310-20; brevetto U.S. 5.801.154; brevetto U.S. 5.789.573; brevetto U.S. 5.718.709 e brevetto U.S. 5.610.288). Inoltre, sono anche stati descritti costrutti antisenso che inibiscono e che possono essere usati per trattare una varietà di proliferazione cellulari anomale, ad esempio cancro (brevetto U.S. 5.747.470; brevetto U.S. 5.591.317 e brevetto U.S. 5.783.683).

Metodi per la produzione di oligonucleotidi antisenso sono noti nella tecnica e possono essere facilmente adatti a produrre un oligonucleotide antisenso che mira qualsiasi sequenza polinucleotidica. La selezione di sequenze oligonucleotidiche antisenso specifiche per una data sequenza bersaglio si basa sull'analisi della sequenza bersaglio selezionata e la determinazione di struttura secondaria, T_m , energia di legame e stabilità relativa. Oligonucleotidi antisenso possono essere selezionati in base alla loro relativa inabilità a formare dimeri, forcine o altre strutture secondarie che ridurrebbero o impedirebbero il legame specifico all'mRNA bersaglio in una cellula ospite. Regioni bersaglio altamente preferite dell'mRNA includono le regioni su o vicino al codone di inizio della traduzione di AUG e le sequenze che sono sostanzialmente complementari alle regioni in 5' dell'mRNA. Queste analisi della

M104.D1.SM.1DE

struttura secondaria e le considerazioni della selezione del sito bersaglio possono essere realizzate, ad esempio, usando v.4 del software di analisi dei primer OLIGO (Molecular Biology Insights) e/o il software degli algoritmi BLASTN 2.0.5 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25(17):3389-402).

Antagomir

Gli antagomir sono oligonucleotidi simili a RNA che contengono varie modificazioni per la protezione dell'RNasi e le proprietà farmacologiche quali l'assorbimento tissutale e cellulare potenziato. Essi differiscono dall'RNA normale, ad esempio, per la completa 2'-O-metilazione dello zucchero, lo scheletro del fosforotioato e, ad esempio, una frazione caratteristica colesterolo sull'estremità 3'. Gli antagomir possono essere usati per silenziare in modo efficiente miRNA endogeni formando duplex comprendenti l'antagomir e l'miRNA endogeno, prevenendo così il silenziamento del gene indotto da miRNA. Un esempio di silenziamento di miRNA mediato da antagomir è il silenziamento di miR-122, descritto in Krutzfeldt *et al.*, Nature, 2005, 438: 685-689. RNA di antagomir possono essere sintetizzati usando protocolli di sintesi oligonucleotidica in fase solida standard. Si veda la domanda di brevetto US Ser. n. 11/502.158 e 11/657.341.

Un antagomir può includere subunità monomeriche ligando-coniugate e monomeri per la sintesi oligonucleotidica. Monomeri esemplificativi sono descritti nella domanda U.S. n. 10/916.185, depositata il 10 agosto 2004. Un antagomir può avere una struttura

M104.D1.SM.1DE

ZXY come descritto nella domanda PCT n. PCT/US2004/07070 depositata l'8 marzo 2004. Un antagomir può essere complessato con una frazione caratteristica anfipatica. Frazioni caratteristiche anfipatiche esemplificative per l'uso come agenti oligonucleotidici sono descritti nella domanda PCT n. PCT/US2004/07070, depositata l'8 marzo 2004.

Aptameri

Gli aptameri sono molecole di acido nucleico o peptidiche che si legano a una particolare molecola di interesse con elevata affinità e specificità (Tuerk and Gold, Science 249:505 (1990); Ellington and Szostak, Nature 346:818 (1990)). Aptameri di DNA o RNA sono stati prodotti con successo i quali si legano con molte diverse entità da grandi proteine a piccole molecole organiche. Si veda Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 10-16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9:324-9(1999), e Hermann and Patel, Science 287:820-5 (2000). Gli aptameri possono essere a base di RNA o di DNA e possono includere un riboswitch. Un riboswitch è una parte di una molecola di mRNA che può legare direttamente una piccola molecola bersaglio e il cui legame del bersaglio influisce l'attività del gene. Pertanto, un mRNA che contiene un riboswitch è direttamente coinvolto nella regolazione della sua propria attività, a seconda della presenza o dell'assenza della sua molecola bersaglio. In generale, aptameri sono ingegnerizzati attraverso cicli ripetuti di selezione *in vitro* o in modo equivalente, SELEX (evoluzione sistematica di ligandi mediante arricchimento esponenziale) per legarsi a vari bersagli molecolari quali piccole molecole, proteine, acidi nucleici e anche cellule, tessuti e

M104.D1.SM.1DE

organismi. L'aptamero può essere preparato mediante qualsiasi metodo noto, inclusi metodi di sintesi, ricombinanti e di purificazione e possono essere usati da soli o in combinazione con altri aptameri specifici per lo stesso bersaglio. Inoltre, come descritto più completamente qui, il termine "aptamero" include in particolare "aptameri secondari" contenenti una sequenza consenso derivato dal confronto di due o più aptameri noti con un dato bersaglio.

Ribozimi

Secondo un'ulteriore forma di realizzazione descritta qui, particelle di acido nucleico-lipide sono associate a ribozimi. I ribozimi sono complessi di RNA-proteina aventi domini catalitici specifici che possiedono attività endonucleasica (Kim and Cech, Proc Natl Acad Sci U S A. dicembre 1987; 84(24):8788-92; Forster and Symons, Cell. 24 aprile 1987; 49(2):211-20). Ad esempio, un gran numero di ribozimi accelera le reazioni di trasferimento di fosfoestere con un elevato grado di specificità, spesso scindendo soltanto uno di parecchi fosfoesteri in un substrato oligonucleotidico (Cech *et al.*, Cell. Dicembre 1981; 27(3 Pt 2):487-96; Michel and Westhof, J Mol Biol. 5 dicembre 1990; 216(3):585-610; Reinhold-Hurek and Shub, Nature. 14 maggio 1992; 357(6374):173-6). Questa specificità è stata attribuita al requisito che il substrato si lega attraverso interazioni di appaiamento di basi specifiche alla sequenza di guida interna ("IGS") del ribozima prima della reazione chimica.

Almeno sei varietà basiche di RNA enzimatici naturali sono

M104.D1.SM.1DE

attualmente note. Ognuno può catalizzare l'idrolisi di legami fosfodiesteri RNA *in trans* (e pertanto può scindere altre molecole di RNA) in condizioni fisiologiche. In generale, gli acidi nucleici enzimatici agiscono legandosi dapprima a un RNA bersaglio. Tale legame si verifica tramite la porzione di legame bersaglio di un acido nucleico enzimatico che è tenuta in stretta prossimità a una porzione enzimatica della molecola che agisce per scindere l'RNA bersaglio. Pertanto, l'acido nucleico enzimatico riconosce dapprima e quindi si lega a un RNA bersaglio tramite appaiamento delle basi complementari e una volta legato al sito corretto agisce enzimaticamente per tagliare l'RNA bersaglio. La scissione strategica di un tale RNA bersaglio distruggerà la sua capacità a guidare la sintesi di una proteina codificata. Dopo che un acido nucleico enzimatico si è legato e ha scisso il suo bersaglio di RNA, esso viene rilasciato da tale RNA per cercare un altro bersaglio e può ripetutamente legare e scindere nuovi bersagli.

La molecola di acido nucleico enzimatica può essere formata ad esempio in un motivo testa di martello, forcina, virus dell'epatite δ , introne di gruppo I o RNA di RNasiP (in associazione con una sequenza di guida dell'RNA) o di VS RNA di *Neurospora*. Esempi specifici di motivi testa di martello sono descritti da Rossi *et al.* *Nucleic Acids Res.* 11 settembre 1992; 20(17):4559-65. Esempi di motivi forcina sono descritti da Hampel *et al.* (pubblicazione di domanda di brevetto europea n. EP 0360257), Hampel and Tritz, *Biochemistry* 13 giugno 1989; 28(12):4929-33; Hampel *et al.*, *Nucleic*

M104.D1.SM.1DE

Acids Res. 25 gennaio 1990; 18(2):299-304 e brevetto U.S. 5.631.359. Un esempio del motivo virus dell'epatite δ è descritto da Perrotta and Been, Biochemistry. 1 dicembre 1992; 31(47):11843-52; un esempio del motivo RNasiP è descritto da Guerrier-Takada *et al.*, Cell. Dicembre 1983; 35(3 Pt 2):849-57; un motivo VS RNA ribozima di Neurospora è descritto da Collins (Saville and Collins, Cell. 18 maggio 1990; 61(4):685-96; Saville and Collins, Proc Natl Acad Sci U S A. 1 ottobre 1991; 88(19):8826-30; Collins and Olive, Biochemistry. 23 marzo 1993; 32(11):2795-9); e un esempio dell'introne gruppo I è descritto nel brevetto U.S. 4.987.071. Caratteristiche importanti di molecole di acido nucleico enzimatico usate secondo l'invenzione sono il fatto che esse hanno un sito di legame al substrato specifico che è complementare a una o più regioni di DNA o RNA del gene bersaglio e che hanno sequenze nucleotidiche all'interno di o che circondano tale sito di legame al substrato che conferisce un'attività di scissione dell'RNA alla molecola. Pertanto i costrutti di ribozima devono essere limitati ai motivi specifici citati qui.

Metodi di produzione di un ribozima mirati verso una qualsiasi sequenza polinucleotidica sono noti nella tecnica. I ribozimi possono essere progettati come descritto nella pubblicazione di domanda di brevetto internazionale n. WO 93/23569 e pubblicazione di domanda di brevetto internazoinale n. WO 94/02595, e sintetizzati per essere testati *in vitro* e *in vivo*, come descritto qui. L'attività di ribozima può essere ottimizzata alterando la lunghezza dei bracci di

M104.D1.SM.1DE

legame al ribozima o sintetizzando chimicamente i ribozimi con modificazioni che prevengono la loro degradazione mediante ribonucleasi serica (si veda ad esempio, la pubblicazione di domanda di brevetto internazionale n. WO 92/07065; la pubblicazione di domanda di brevetto internazionale n. WO 93/15187; la pubblicazione di domanda di brevetto internazionale n. WO 91/03162; la pubblicazione di domanda di brevetto europeo n. 92110298.4; il brevetto U.S. 5.334.711; e la pubblicazione di domanda di brevetto internazionale n. WO 94/13688, che descrivono varie modificazioni chimiche che possono essere effettuate alle frazioni caratteristiche zucchero di molecole di RNA enzimatico), modificazioni che potenziano la loro efficacia nelle cellule e la rimozione delle basi dello stelo II per accorciare i tempi di sintesi dell'RNA e ridurre i requisiti chimici.

Sequenze di acido nucleico specifiche aggiuntive di oligonucleotidi (ODN) adeguate per uso nelle composizioni e nei metodi descritti qui, sono descritti nella domanda di brevetto U.S. 60/379.343, nella domanda di brevetto U.S. Ser. n. 09/649.527, pubblicazione internazionale WO 02/069369, pubblicazione internazionale n. WO 01/15726, brevetto U.S. n. 6.406.705, e Raney *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001). In alcune forme di realizzazione, ODN usati nelle composizioni e metodi descritti qui hanno uno scheletro fosfodiesterico ("PO") o uno scheletro fosforotioato ("PS"), e/o almeno un residuo citosina metilato nel motivo CpG.

Modificazioni di acido nucleico

Negli anni '90, oligodeossinucleotidi antisenso a base di DNA (ODN) e ribozimi (RNA) hanno rappresentato un nuovo paradigma interessante per la progettazione e lo sviluppo di farmaci, tuttavia la loro applicazione *in vivo* è stata impedita dall'attività endonucleasica ed esonucleasica nonché dalla mancanza di rilascio intracellulare positivo. La questione della degradazione è stata efficacemente superata successivamente ad ampia ricerca nelle modificazioni chimiche che prevenivano che i farmaci oligonucleotidi (oligo) venissero riconosciuti da enzimi nucleasici ma senza inibirne il meccanismo di azione. Questa ricerca ha avuto tale successo che i farmaci ODN antisenso in fase attualmente di sviluppo rimangono intatti *in vivo* per giorni rispetto a minuti per le molecole non modificate (Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270:1628-44). Tuttavia, i problemi di rilascio intracellulare e del meccanismo di azione hanno finora limitato ODN antisenso e ribozimi nel divenire prodotti clinici.

Duplex di RNA sono intrinsecamente più stabili alle nucleasi rispetto a DNA o RNA a singolo filamento, e diversamente da ODN antisenso, siRNA non modificato mostra buona attività una volta che accedono al citoplasma. Anche così, le modificazioni chimiche sviluppate per stabilizzare ODN antisenso e ribozimi sono state anche sistematicamente applicate a siRNA per determinare quanta modificazione chimica possa essere tollerata e se l'attività

M104.D1.SM.1DE

farmacocinetica e farmacodinamica possa essere potenziata. L'RNA interferenza nei duplex di siRNA richiede un filamento antisenso e un filamento senso che hanno diverse funzioni. Entrambi sono necessari a consentire che siRNA entri nel RISC, tuttavia una volta caricati i due filamenti si separano e il filamento senso è degradato mentre il filamento antisenso rimane per guidare RISC nel mRNA bersaglio. L'ingresso in RISC è un processo che è strutturalmente meno stringente rispetto al riconoscimento e alla scissione di mRNA bersaglio. Di conseguenza, molte diverse configurazioni chimiche del filamento senso sono possibili ma soltanto variazioni limitate sono tollerate dal filamento antisenso (Zhang et al., 2006).

Come è noto nella tecnica, un nucleoside è una combinazione di base-zucchero. Nucleotidi sono nucleosidi che includono inoltre un gruppo fosfato legato in modo covalente alla porzione zucchero del nucleoside. Per i nucleosidi che includono uno zucchero pentofuranosile, il gruppo fosfato può essere legato alla frazione caratteristica 2', 3' o 5' ossidrile dello zucchero. Nel formare oligonucleotidi, i gruppi fosfato legano in modo covalente nucleosidi adiacenti uno all'altro così da formare un composto polimerico lineare. A loro volta, le rispettive estremità di questa struttura polimerica lineare possono inoltre essere unite così da formare una struttura circolare. All'interno della struttura oligonucleotidica, i gruppi fosfato sono comunemente indicati così da formare lo scheletro internucleosidico dell'oligonucleotide. Il legame normale o lo scheletro di RNA e DNA è un legame da 3' a 5' fosfodiester.

M104.D1.SM.1DE

L'acido nucleico che è usato in una particella lipide-acido nucleico descritto qui, include qualsiasi forma di acido nucleico nota. Pertanto, l'acido nucleico può essere un acido nucleico modificato del tipo usato precedentemente per potenziare la resistenza nucleasica e la stabilità serica. Sorprendentemente, tuttavia, prodotti terapeutici accettabili possono anche essere preparati usando il metodo descritto qui per formulare particelle di lipide-acido nucleico da acidi nucleici che non hanno modificazione nei legami fosfodiesterici di polimeri di acido nucleico naturali e l'uso di acidi nucleici fosfodiesterici non modificato (ossia, acidi nucleici in cui tutti i legami sono legami fosfodiesterici) è una forma di realizzazione preferita.

Modificazioni dello scheletro

siRNA antisenso e altri oligonucleotidi utili qui includono, senza limitazione, oligonucleotidi contenenti scheletri modificati o legami internucleosidici non naturali. Oligonucleotidi con scheletri modificati includono quelli che conservano un atomo di fosforo nello scheletro e quelli che non hanno l'atomo di fosforo nello scheletro. Oligonucleotidi modificati che non hanno un atomo di fosforo nel loro scheletro internucleosidico possono anche essere considerati oligonucleosidi. Scheletri oligonucleotidici modificati includono, ad esempio, fosforotioati, fosforotioati chirali, fosforoditioati, fosfotriesteri, amminoalchilfosfotri-esteri, metil fosfonati e altri alchil fosfonati inclusi 3'-alchilen fosfonati e fosfonati chirali, fosfinati, fosforamidati inclusi 3'-ammino fosforamidato e

M104.D1.SM.1DE

amminoalchilfosforamidati, tionofosforamidati, tiono-alchilfosfonati, tionoalchilfosfotriesteri, fosforoselenato, metil-fosfonato, o legami O-alchil fosfotriestere, e boranofosfati aventi legami 3'-5' normali, analoghi 2'-5' legati di questi, e quelli aventi polarità inversa in cui le coppie adiacenti di unità nucleosidiche sono legate 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Particolari esempi non limitativi di queste modificazioni che possono essere presenti in un acido nucleico descritto qui sono mostrati nella Tabella 2.

Vari sali, sali misti di forme di acido libero sono anche inclusi. Brevetti statunitensi rappresentativi che descrivono la preparazione dei suddetti legami includono, senza limitazione i brevetti U.S. n. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; e 5.625.050.

In alcune forme di realizzazione, scheletri oligonucleotidici modificati che non includono un atomo di fosforo all'interno hanno scheletri che sono formati da legami internucleosidici, alchile o cicloalchile a catena corta, eteroatomi misti e legami internucleosidici alchile o cicloalchile o uno o più legami internucleosidici eteroatomici o eterociclici a catena corta. Questi includono, ad esempio, quelli aventi legami morfolino (formati in parte dalla porzione zucchero di un nucleoside); scheletri silossano; scheletri solfuro, solfossido e solfone; scheletri formacetile e

M104.D1.SM.1DE

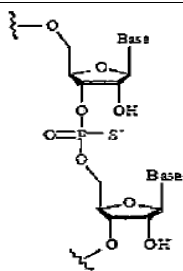
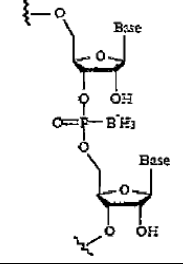
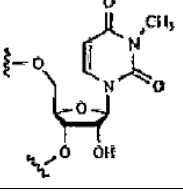
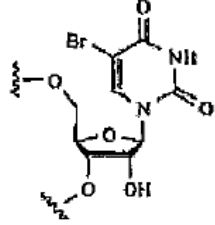
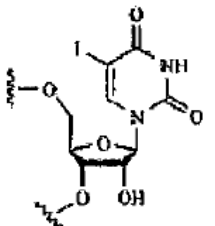
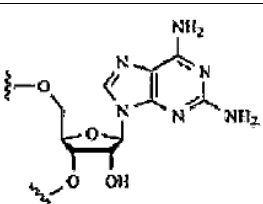
tioformacetile; scheletri metilen formacetile e tioformacetile; scheletri contenenti alchene; scheletri solfammato; scheletri metilenimmino e metilenidrazino; scheletri solfonato e solfonammide; scheletri ammidie; e altri aventi parti componenti N, O, S e CH₂. Brevetti statunitensi rappresentativi che descrivono i suddetti oligonucleosidi includono, senza limitazione, i brevetti U.S. n. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; e 5.677.439.

La modificazione dello scheletro fosforotioato (Tabella 3, n. 1), in cui un ossigeno non di legame a ponte nel legame fosfodiester è sostituito da zolfo, è uno dei mezzi più precoci e più comuni impiegati per stabilizzare farmaci di acido nucleico contro la degradazione nucleasica. In generale, sembra che modificazioni di PS possano essere effettuate ampiamente a entrambi i filamenti di siRNA senza grande impatto sull'attività (Kurreck, J., *Eur. J. Biochem.* 270:1628-44, 2003). Tuttavia, oligo PS sono noti associarsi in modo avido non specificatamente a proteine determinanti tossicità, in particolare in seguito a somministrazioni i.v. Pertanto, la modificazione PS è solitamente limitata a una o più basi sull'estremità 3' e 5'. Il linker boranofosfato (Tabella 3, n. 2) è una modificazione recente che è apparentemente più stabile rispetto a PS, potenzia l'attività di siRNA e ha bassa tossicità (Hall *et al.*,

M104.D1.SM.1DE

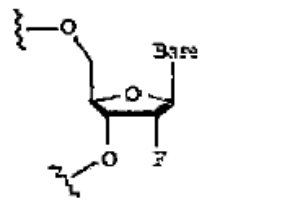
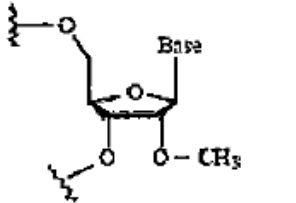
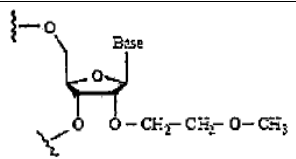
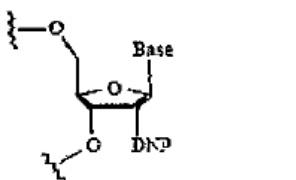
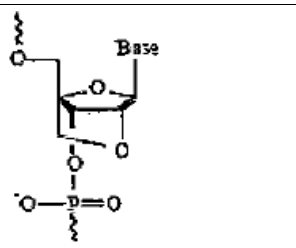
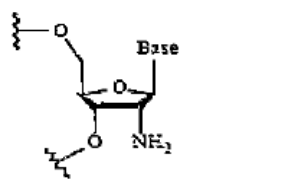
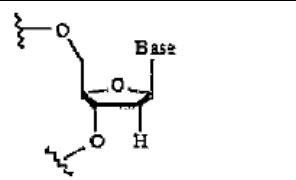
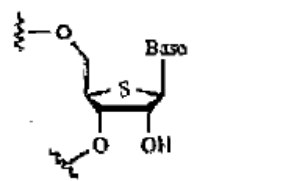
Nucleic Acids Res. 32:5991-6000, 2004).

**Tabella 3 - Modificazioni chimiche applicate a siRNA
e altri acidi nucleici**

N.	Abbreviazione	Nome	Sito di modificazione	Struttura
1	PS	Fosforotioato	Scheletro	
2	PB	Boranofosfato	Scheletro	
3	N3-MU	N3-metil-uridina	Base	
4	5'-BU	5'-bromo-uracile	Base	
5	5'-IU	5'-iodo-uracile	Base	
6	2,6-DP	2,6-diamminopurina	Base	

M104.D1.SM.1DE

(continua)

N.	Abbreviazione	Nome	Sito di modificazione	Struttura
7	2'-F	2'-Fluoro	Zucchero	
8	2'-OME	2''-O-metile	Zucchero	
9	2'-O-MOE	2'-O-(2-metossiletile)	Zucchero	
10	2'-DNP	2'-O-(2,4-dinitrofenile)	Zucchero	
11	LNA	Acido nucleico bloccato (ponte metilene che connette l'ossigeno 2' con il carbonio 4' dell'anello ribosio)	Zucchero	
12	2'-Ammino	2'-Ammino	Zucchero	
13	2'-Deossi	2'-Deossi	Zucchero	
14	4'-tio	4'-tio-ribonucleotide	Zucchero	

Altri derivati di acidi nucleici includono le molecole di acido nucleico in cui gli atomi di ossigeno a ponte (quelli formanti legami

M104.D1.SM.1DE

fosfoestere) sono stati sostituiti con -S-, -NH-, -CH₂- e simili. In alcune forme di realizzazione, le alterazioni all'antisense siRNA, o altri acidi nucleici usati non influenzeranno completamente le cariche negative associate agli acidi nucleici. Pertanto, l'uso di antisense, siRNA, e altri acidi nucleici in cui una porzione dei legami sostituita con, ad esempio, legami metil fosfonato o fosforamidato neutri è contemplato. Quando si usano legami neutri, in alcune forme di realizzazione meno di 80% dei legami di acido nucleico sono in tal modo sostituiti, o meno di 50% dei legami sono in tal modo sostituiti.

Modificazioni delle basi

Modificazioni delle basi sono meno comuni rispetto a quelle dello scheletro e dello zucchero. Le modificazioni mostrate in 0,3-6 sembrano tutte stabilizzare siRNA contro nucleasi e avere scarso effetto sull'attività (Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C, Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr Top Med Chem* 6:893-900).

Di conseguenza, gli oligonucleotidi possono anche includere modificazioni o sostituzioni di nucleobasi (spesso indicate nella tecnica semplicemente come "base"). Come usato qui, nucleobasi "non modificate" o "naturali" includono le basi puriniche adenina (A) e guanina (G) e le basi pirimidiniche timina (T), citosina (C) e uracile (U). Nucleobasi modificate includono altre nucleobasi sintetiche e naturali quali 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), 5-idrossimetil citosina, xantina, ipoxantina, 2-amminoadenina, 6-metile

M104.D1.SM.1DE

e altri derivati alchile di adenina e guanina, 2-propile e altri derivati alchile di adenina e guanina, 2-tiouracile, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-alouracile e citosina, 5-propinil uracile e citosina, 6-azo uracile, citosina e timina, 5-uracile (pseudouracile), 4-tiouracile, 8-alo, 8-ammino, 8-tiolo, 8-tioalchile, 8-ossidrile e altre adenine e guanine 8-sostituite, 5-alo in particolare 5-bromo, 5-trifluorometile e altri uracili e citosine 5-sostituiti, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-deazaguanina e 7-deazaadenina e 3-deazaguanina e 3-deazaadenina.

Alcune nucleobasi sono particolarmente utili per aumentare l'affinità di legame dei composti oligomerici descritti qui incluse pirimidine 5-sostituite, 6-azapirimidine e purine N-2, N-6 e O-6 sostituite, incluse sostituzioni 2-amminopropiladenina, 5-propiniluracile e 5-propinilcitosina, 5-metilcitosina che hanno mostrato aumentare la stabilità dei duplex di acido nucleico a 0,6-1,2°C. (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. e Lebleu, B., ed., *Antisense Research and Applications* 1993, CRC Press, Boca Raton, pagine 276-278). Questi possono essere combinati in particolari forme di realizzazione con modificazioni zucchero 2'-O-metossietile. Brevetti statunitensi che descrivono la preparazione di alcune di queste nucleobasi modificate nonché di altre nucleobasi modificate includono, senza limitazione, il brevetto U.S. n. 3.687.808, nonché i brevetti U.S. n. 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; e

M104.D1.SM.1DE

5.681.941.

Modificazioni zucchero

La maggior parte delle modificazioni del gruppo zucchero avviene in 2'-OH dell'anello dello zucchero di RNA che fornisce un sito chimicamente reattivo adeguato (Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 8:570-9; Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C, Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr Top Med Chem* 6:893-900). 2'-F e 2'-OME (0,7 e 8) sono comuni ed entrambi aumentano la stabilità. La modificazione 2'-OME non riduce l'attività purché sia limitata a meno di 4 nucleotidi per filamento (Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E., Prydz, H. 2003. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 31:2401-7). 2'-O-MOE (0,9) è massimamente efficace nel siRNA quando le basi modificate sono limitate alla regione centrale della molecola (Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bhat, B. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J Med Chem* 48:4247-53). Altre modificazioni che sono risultate stabilizzare siRNA senza perdita di attività sono mostrate in 0,10-14.

Oligonucleotidi modificati possono anche contenere una o più frazioni caratteristiche zucchero sostituite. Ad esempio, sono inclusi qui oligonucleotidi che comprendono uno dei seguenti nella

M104.D1.SM.1DE

posizione 2': OH; F; O-, S-, o N-alchile, O-alchil-O-alchile, O-, S-, o N-alchenile, o O-, S- o N-alchinile, in cui alchile, alchenile e alchinile possono essere C₁-C₁₀ alchile sostituito o non sostituito o C₂-C₁₀ alchenile e alchinile. Particolarmente preferiti sono O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, e O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, in cui n ed m sono da 1 a circa 10. Altri oligonucleotidi preferiti comprendono uno dei seguenti in posizione 2': C₁-C₁₀ alchile a catena corta, alchile a catena corta sostituito, alcarile, aralchile, O-alcarile o O-aralchile, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, eterocicloalchile, eterocicloalcarile, amminoalchil-ammino, polialchilammino, silile sostituito, un gruppo di scissione di RNA, un gruppo reporter, un agente di intercalazione, un gruppo per migliorare le proprietà farmacocinetiche di un oligonucleotide, o un gruppo per migliorare le proprietà farmacodinamiche di un oligonucleotide e altri sostituenti aventi proprietà simili. Una modificazione include 2'-metossietossi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, nota anche come 2'-O-(2-metossietile) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486-504), ossia un gruppo alcossialcossi. Altre modificazioni includono 2'-dimetilamminoossietossi, ossia, un gruppo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, noto anche come 2'-DMAOE, e 2'-dimetilammino-etossietossi (2'-DMAEOE).

Ulteriori modificazioni includono 2'-metossi (2'-O-CH₃), 2'-amminopropossi (2'-O-CH₂CH₂CH₂NH₂) e 2'-fluoro (2'-F). Modificazioni simili possono anche essere effettuate su altre posizioni

M104.D1.SM.1DE

sull'oligonucleotide, in particolare la posizione 3' dello zucchero sul nucleotide 3' terminale o in oligonucleotidi associati in 2'-5' e la posizione 5' del nucleotide 5' terminale. Oligonucleotidi possono anche avere mimetici dello zucchero quali frazioni caratteristiche ciclobutile al posto di zucchero pentofuranosile. Brevetti statunitensi rappresentativi che descrivono la preparazione di tali strutture di zucchero modificate includono, senza limitazione, i brevetti U.S. n. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; e 5.700.920.

In altri mimetici oligonucleotidici, entrambi il legame zucchero e internucleoside, ossia lo scheletro delle unità nucleotidiche sono sostituiti con nuovi gruppi sebbene le unità di basi siano mantenute per l'ibridazione con un composto di bersaglio di acido nucleico adeguato. Un tale composto oligomero, un mimetico oligonucleotidico che è risultato avere eccellenti proprietà di ibridazione è indicato come acido nucleico peptidico (PNA). In composti di PNA, lo scheletro dello zucchero di un oligonucleotide è sostituito con uno scheletro contenente ammidi, in particolare uno scheletro amminoetilglicina. Le nucleobasi sono conservate e sono legate direttamente o indirettamente agli atomi di azoto aza della porzione amidica dello scheletro. Brevetti statunitensi rappresentativi che descrivono la preparazione di composti di PNA includono, senza limitazione, i brevetti U.S. n. 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262. Ulteriore

M104.D1.SM.1DE

insegnamento di composti di PNA può essere trovato in Nielsen et al. (Science, 1991, 254, 1497-1500).

Forme di realizzazione particolari descritte qui sono oligonucleotidi con scheletri fosforotioato e oligonucleosidi con scheletri eteroatomici e in particolare $--CH_2--NH--O--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ (indicato come metilene (metilimmino) o scheletro MMI) $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ e $--O--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ (in cui lo scheletro fosfodiesterico nativo è rappresentato come $--O--P--O--CH_2--$) del brevetto U.S. n. 5.489.677 sopra indicato, e gli scheletri amidici del brevetto U.S. n. 5.602.240 sopra indicato. Sono anche preferiti oligonucleotidi aventi strutture di scheletro morfolino del brevetto U.S. n. 5.034.506 sopra indicato.

Il gruppo zucchero può anche contenere uno o più atomi di carbonio che possiedono l'opposta configurazione stereochimica rispetto a quella del corrispondente carbonio nel ribosio. Pertanto, un oligonucleotide può includere nucleotidi contenenti per esempio arabinosio come lo zucchero. Il monomero può avere un legame alfa in posizione 1' sullo zucchero, ad esempio, alfa-nucleosidi. Gli oligonucleotidi possono anche includere zuccheri "abasici", privi di una nucleobase in C-1'. Questi zuccheri abasici possono anche contenere ulteriormente modificazioni su uno o più atomi di zucchero costitutivi. Oligonucleotidi possono anche contenere uno o più zuccheri che sono nella forma L, ad esempio, L-nucleosidi.

Oligonucleotidi chimerici

M104.D1.SM.1DE

Non è necessario che tutte le posizioni in un dato composto siano modificati in modo uniforme e di fatto, più di una delle modificazioni sopra citate, possono essere incorporati in un singolo composto o anche su un singolo nucleoside all'interno di un oligonucleotide. Alcuni oligonucleotidi preferiti descritti qui sono oligonucleotidi chimerici. "Oligonucleotidi chimerici" o "chimere", nel contesto della presente, sono oligonucleotidi che contengono due o più regioni chimicamente distinte ognuna costituita da fino a un nucleotide. Questi oligonucleotidi contengono tipicamente almeno una regione di nucleotidi modificati che conferisce una o più proprietà benefiche (quali, ad esempio, resistenza alla nucleasi aumentata, assorbimento aumentato nelle cellule, affinità di legame aumentata per il bersaglio di RNA) e una regione che è un substrato per la scissione di RNasi H.

In una forma di realizzazione, un oligonucleotide chimerico comprende almeno una regione modificata per aumentare l'affinità di legame al bersaglio. L'affinità di un oligonucleotide per il suo bersaglio è determinata di consueto misurando la T_m della coppia oligonucleotide/bersaglio, che è la temperatura alla quale l'oligonucleotide e il bersaglio si dissociano; la dissociazione è rivelata a livello spettrofotometrico. Superiore è la T_m maggiore è l'affinità dell'oligonucleotide per il bersaglio. In una forma di realizzazione, la regione dell'oligonucleotide che è modificata per aumentare l'affinità di legame a mRNA bersaglio comprende almeno un nucleotide modificato nella posizione 2' dello zucchero, in modo massimamente

M104.D1.SM.1DE

preferibile un nucleotide 2'-O-alchile, 2'-O-alchil-O-alchile o 2'-fluoro-modificato. Tali modificazioni sono incorporate di consueto negli oligonucleotidi e questi oligonucleotidi sono risultati avere una T_m superiore (ossia un'affinità di legame al bersaglio superiore) rispetto a 2'-deossioligonucleotidi contro un dato bersaglio. L'effetto di tale affinità aumentata è di potenziare fortemente l'inibizione oligonucleotidica dell'espressione del gene bersaglio.

In un'altra forma di realizzazione, un oligonucleotide chimerico comprende una regione che agisce come substrato per RNasi H. Ovviamente, si intende che gli oligonucleotidi possono includere qualsiasi combinazione di varie modificazioni descritte qui.

Un'altra modificazione degli oligonucleotidi descritti qui implica il legame chimico all'oligonucleotide di una o più frazioni caratteristiche o coniugati che potenziano l'attività, la distribuzione cellulare e l'assorbimento cellulare dell'oligonucleotide. Tali coniugati e metodi di preparazione degli stessi sono noti nella tecnica.

Gli esperti nella tecnica realizzeranno che per l'utilità *in vivo*, quale l'efficacia terapeutica, una regola generale ragionevole è che se una versione tioata della sequenza opera nella forma libera, tali particelle incapsulate della stessa sequenza, di qualsiasi chimica, saranno anche efficaci. Le particelle incapsulate della stessa sequenza, di qualsiasi chimica saranno anche efficaci. Le particelle incapsulate possono avere un'ampia gamma di utilità *in vivo* mostrando efficacia in condizioni e modelli non noti essere

M104.D1.SM.1DE

diversamente responsivi a terapia antisenso. Gli esperti nella tecnica sanno che applicando la presente invenzione possono trovare vecchi modelli che rispondono ora alla terapia antisenso. Inoltre, possono rivisitare sequenze antisenso o chimiche scartate e trovare efficacia mediante l'impiego dell'invenzione.

Gli oligonucleotidi usati secondo la presente invenzione possono essere adeguatamente o di consueto realizzati tramite tecniche ben note di sintesi in fase solida. L'apparecchiatura per tale sintesi è venduta da parecchi fornitori inclusi ad esempio Applied Biosystems. Qualsiasi altro mezzo per tale sintesi può anche essere impiegato; la sintesi effettiva degli oligonucleotidi rientra decisamente nei compiti dell'esperto ordinario. È anche ben noto l'uso di tecniche simili per preparare altri oligonucleotidi quali fosforotioati e derivati alchilati.

Oligonucleotidi immunostimolatori

Acidi nucleici associati a particelle lipidiche descritte qui possono essere immunostimolatori, inclusi oligonucleotidi immunostimolatori (ISS; a singolo o a doppio filamento) in grado di indurre una risposta immunitaria quando somministrati in un soggetto che può essere un mammifero o altro paziente. ISS includono, ad esempio, alcuni palindromi che determinano strutture secondarie a forcina (si veda Yamamoto S., et al. (1992) J. Immunol. 148:4072-4076), o motivi CpG, nonché altre caratteristiche ISS note (quali domini multi-G, si veda WO 96/11266).

La risposta immunitaria può essere una risposta immunitaria

M104.D1.SM.1DE

innata o adattativa. Il sistema immunitario è diviso nel sistema immunitario più innato e nel sistema immunitario adattativo acquisito di vertebrati, l'ultimo dei quali è ulteriormente diviso in componenti cellulari umorali. In particolari forme di realizzazione, la risposta immunitaria può essere mucosale.

In particolari forme di realizzazione, un acido nucleico immunostimolatorio è soltanto immunostimolatorio quando somministrato in combinazione con una particella lipidica e non è immunostimolatorio quando somministrato nella sua "forma libera". Secondo la presente invenzione, un tale oligonucleotide è considerato immunostimolatorio.

Acidi nucleici immunostimolatori sono considerati non sequenza specifici quando non è richiesto che si leghino in modo specifico e riducano l'espressione di un polinucleotide bersaglio al fine di provocare una risposta immunitaria. Pertanto, alcuni acidi nucleici immunostimolatori possono comprendere una sequenza corrispondente a una regione di un gene naturale o mRNA ma possono ancora essere considerati acidi nucleici immunostimolatori non sequenza specifici.

In una forma di realizzazione, l'acido nucleico immunostimolatorio o oligonucleotide comprende almeno un dinucleotide CpG. L'oligonucleotide o dinucleotide CpG può essere non metilato o metilato. In un'altra forma di realizzazione, l'acido nucleico immunostimolatorio comprende almeno un dinucleotide CpG avente una citosina metilata. In una forma di realizzazione, l'acido nucleico comprende un singolo dinucleotide CpG in cui la citosina in detto

M104.D1.SM.1DE

dinucleotide CpG è metilata. In una forma di realizzazione specifica, l'acido nucleico comprende la sequenza 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3'. In una forma di realizzazione alternativa, l'acido nucleico comprende almeno due dinucleotidi CpG, in cui almeno una citosina nei dinucleotidi CpG è metilata. In un'ulteriore forma di realizzazione, ogni citosina nei dinucleotidi CpG presente nella sequenza è metilata. In un'altra forma di realizzazione, l'acido nucleico comprende una pluralità di dinucleotidi CpG, in cui almeno uno di detti dinucleotidi CpG comprende una citosina metilata.

In una forma di realizzazione specifica, l'acido nucleico comprende la sequenza 5' TTCCATGACGTTCTGACGT 3'. In un'altra forma di realizzazione specifica, la sequenza di acido nucleico comprende la sequenza 5' TCCATGACGTTCTGACGT 3', in cui le due citosine indicate in grassetto sono metilate. In particolari forme di realizzazione, l'ODN è selezionata da un gruppo di ODN che consistono in ODN n. 1, ODN n. 2, ODN n. 3, ODN n. 4, ODN n. 5, ODN n. 6, ODN n. 7, ODN n. 8, e ODN n. 9, come mostrato di seguito.

M104.D1.SM.1DE

Tabella 4. Oligonucleotidi immunostimolatori esemplificativi (ODN)

<i>NOME ODN</i>	<i>EQ ID</i>	<i>SEQUENZA ODN (5'-3')</i>
c-myc umano ODN 1		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5'-TCCATGACGTTCTCTGACGTT-3
* ODN 2m		5'-TCCATGAZGTTCTCTGAZGTT-3
ODN 3		5'-TAAGCATAACGGGGTGT-3
ODN 5		5'-AACGTT-3
ODN 6		5'-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
ODN 7		5'-TCGTCGTTTTGTGTTTTGTGCGTT-3'
ODN 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9		5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'
Molecola-1 di adesione intracellulare murina ODN 10		5'-TGCATCCCCCAGGCCACCAT-3
Molecola-1 di adesione intracellulare umana ODN 11		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
Molecola-1 di adesione intracellulare umana ODN 12		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
erb-B-2 umano ODN 13		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
c-myc umano ODN 14		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
c-myc umano ODN 15		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGG-3'
ODN 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
Recettore del fattore 1 di crescita per l'insulina umano ODN 17		5'-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3 '
Recettore del fattore 1 di crescita per l'insulina umano ODN 18		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
Recettore del fattore di crescita epidermica umano ODN 19		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
Recettore del fattore di crescita epidermica ODN 20		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
Fattore di crescita endoteliale vascolare umano ODN 21	5'-CAG	5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
Fosfochinasi C alfa murina ODN 22		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
Bcl-2 umano ODN 24		5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
C-Raf-s umano ODN 25		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
Recettore 1 del fattore di crescita endoteliale vascolare umano ODN n. 26		5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAGUCUG-3'

NOME ODN	EQ ID	SEQUENZA ODN (5'-3')
ODN n. 27		5'-RRCGY-3'
ODN n. 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN n. 29		5'-CAACGTTATGGGAGA-3'
c-myc umano ODN n. 30		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'
<p>"Z" rappresenta un residuo citosina metilato. ODN 14 è un oligo-nucleotide da 15 mer e ODN 1 è lo stesso oligonucleotide avente una timidina addizionata sull'estremità 5' che trasforma ODN 1 in un 16 mer. non si è rivelata alcuna differenza dell'attività biologica tra ODN 14 e ODN 1 ed entrambe presentano attività immunostimolatoria simile (Mui et al., 2001)</p>		

Sequenze di acido nucleico specifiche aggiuntive di oligonucleotidi (ODN) adeguate per l'uso nelle composizioni e nei metodi descritti qui sono descritte in Raney et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298:1185-1192 (2001). In alcune forme di realizzazione, ODN usati nelle composizioni e nei metodi descritti qui hanno uno scheletro fosfodiesterico ("PO") o uno scheletro fosforotioato ("PS") e/o almeno un residuo citosina metilato in un motivo CpG.

Oligonucleotidi esca

Poiché i fattori di trascrizione riconoscono le loro sequenze di legame relativamente corte anche in assenza di DNA genomico circostante, oligonucleotidi corti che portano la sequenza di legame consenso di un fattore di trascrizione specifico possono essere usati come strumenti per la manipolazione dell'espressione genica in cellule viventi. Questa strategia implica il rilascio intracellulare di tali "oligonucleotidi esca" che sono quindi riconosciuti e legati dal fattore bersaglio. L'occupazione del sito di legame al DNA del fattore di trascrizione mediante l'esca rende il fattore di

M104.D1.SM.1DE

trascrizione non in grado di legarsi successivamente alle regioni promotore di geni bersaglio. Esche possono essere usate come agenti terapeutici per inibire o l'espressione di geni che sono attivati da un fattore di trascrizione o modulare positivamente geni che sono soppressi dal legame di un fattore di trascrizione. Esempi dell'uso di oligonucleotidi esca può essere trovato in Mann et al., J. Clin. Invest., 2000, 106:1071-1075.

Supermir

Un supermir si riferisce a un oligomero o polimero a singolo filamento e a doppio filamento o parzialmente a doppio filamento di acido ribonucleico (RNA) o acido deossiribonucleico (DNA) o entrambi loro modificazioni, che ha una sequenza nucleotidica che è sostanzialmente identica a un miRNA e che è antisenso rispetto al suo bersaglio. Questo termine include oligonucleotidi costituiti da nucleobasi naturali, zuccheri e legami internucleosidici (scheletri) covalenti e che contengono almeno una porzione non naturale che funziona similmente. Tali oligonucleotidi modificati o sostituiti sono preferiti rispetto alle forme native per le proprietà desiderabili quali, ad esempio, assorbimento cellulare potenziato, affinità potenziata per bersaglio di acido nucleico e stabilità aumentata in presenza di nucleasi. In una forma di realizzazione preferita, il supermir non include un filamento senso e in un'altra forma di realizzazione preferita, il supermir non autoibrida in una misura significativa. Un supermir caratterizzato qui può avere struttura secondaria, ma è sostanzialmente a singolo filamento in

M104.D1.SM.1DE

condizioni fisiologiche. Un supermir che è sostanzialmente a singolo filamento è a singolo filamento nella misura in cui meno di circa 50% (ad esempio, meno di circa 40%, 30%, 20%, 10% o 5%) del supermir è un duplex con se stesso. Il supermir può includere un segmento a forcina, ad esempio, sequenza, preferibilmente sull'estremità 3' può autoibridare e formare una regione duplex, ad esempio, una regione duplex di almeno 1, 2, 3, o 4 e preferibilmente inferiore a 8, 7, 6 o n nucleotidi, ad esempio, 5 nucleotidi. La regione duplex può essere connessa mediante un linker, ad esempio, un linker nucleotidico, ad esempio, 3, 4, 5, o 6 dT, ad esempio, dT modificati. In un'altra forma di realizzazione, il supermir è reso duplex con un oligo più corto, ad esempio, di 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleotidi in lunghezza, ad esempio, su una o entrambe le estremità 3' e 5' o su una estremità e nel non terminale o al centro del supermir.

Mimetici di miRNA

I mimetici di miRNA rappresentano una classe di molecole che possono essere usate per imitare la capacità di silenziamento genico di uno o più miRNA. Pertanto, l'espressione "mimetico di microRNA" si riferisce ad RNA non codificanti sintetici (ossia miRNA non è ottenuto mediante purificazione da una fonte di miRNA endogeno) che sono in grado di entrare nella via di RNAi e regolare l'espressione genica. Mimetici di miRNA possono essere progettati come molecole mature (ad esempio a singolo filamento) o precursori mimetici (ad esempio, pri-miRNA o pre-miRNA). Mimetici di miRNA possono essere costituiti da acido nucleico (modificati o acidi nucleici modificati)

M104.D1.SM.1DE

inclusi oligonucleotidi compresi, senza limitazione, RNA, RNA modificato, DNA, DNA modificato, acidi nucleici bloccati, o acidi nucleici a ponte di 2'-O,4'-C-etilene (ENA), o qualsiasi combinazione dei suddetti (inclusi ibridi di DNA-RNA). Inoltre, mimetici di miRNA possono comprendere coniugati che possono influenzare il rilascio, la compartimentalizzazione intracellulare, la stabilità, la specificità, la funzionalità, l'uso di filamenti e/o la potenza. In un modello, i mimetici di miRNA sono molecole a doppio filamento (ad esempio, con una regione duplex tra circa 16 e circa 31 nucleotidi di lunghezza) e contengono una o più sequenze che hanno identità con il filamento maturo di un dato miRNA. Le modificazioni possono comprendere modificazioni in 2' (incluse modificazioni 2'-O metile e modificazioni 2' F) su uno o entrambi i filamenti della molecola e modificazioni internucleotidiche (ad esempio modificazioni forfortioato) che potenziano la stabilità e/o la specificità dell'acido nucleico. Inoltre, mimetici di miRNA possono includere sporgenze. Le sporgenze possono consistere di 1-6 nucleotidi sulle estremità 3' o 5' di ogni filamento e possono essere modificati per potenziare la stabilità o la funzionalità. In una forma di realizzazione, un mimetico di miRNA comprende una regione duplex tra 16 e 31 nucleotidi e uno o più dei seguenti pattern di modificazione chimica: il filamento senso contiene le modificazioni 2'-O-metile di nucleotidi 1 e 2 (a partire dall'estremità 5' dell'oligonucleotide senso), e tutti i C e di U; le modificazioni del filamento antisenso possono comprendere la modificazione 2' F di tutti i C e di U, la fosforilazione

M104.D1.SM.1DE

dell'estremità 5' dell'oligonucleotide, e i legami internucleotidici stabilizzati associati alla sporgenza 3' da 2 nucleotidi.

Antimir o inibitore miRNA

Le espressioni "antimir", "inibitore microRNA", "inibitore miR" o "inibitore" sono sinonimi e si riferiscono a oligonucleotidi o oligonucleotidi modificati che interferiscono con la capacità di miRNA specifici. In generale, gli inibitori sono acidi nucleici o acidi nucleici modificati di natura inclusi oligonucleotidi comprendenti RNA, RNA modificato, DNA, DNA modificato, acidi nucleici bloccati (LNA) o qualsiasi combinazione dei suddetti. Le modificazioni includono modificazioni in 2' (incluse le modificazioni 2'-O alchile e modificazioni 2' F) e modificazioni internucleotidiche (ad esempio, modificazioni fosforotioato) che possono influire sul rilascio, la stabilità, la specificità, la compartimentalizzazione intracellulare o la potenza. Inoltre, gli inibitori miRNA possono comprendere coniugati che possono influire sul rilascio, la compartimentalizzazione intracellulare, la stabilità, e/o la potenza. Inibitori possono assumere la varietà di configurazioni incluso singolo filamento, doppio filamento (duplex di RNA/RNA o RNA/DNA) e modelli a forcina, in generale, gli inibitori microRNA comprendono una o più sequenze o porzioni di sequenze che sono complementari o parzialmente complementari con il filamento maturo (o filamenti) di miRNA da mirare, inoltre, l'inibitore miRNA può anche comprendere sequenze aggiuntive situate in 5' e 3' rispetto alla sequenza che è il complemento inverso di miRNA maturo. Le sequenze aggiuntive possono

M104.D1.SM.1DE

essere i complementi inversi delle sequenze che sono adiacenti a miRNA maturo nel pri-miRNA da cui miRNA maturo è derivato, o le sequenze aggiuntive possono essere sequenze arbitrarie (aventi una miscela di A, G, C o U). In alcune forme di realizzazione, una o entrambe le sequenze aggiuntive sono sequenze arbitrarie in grado di formare forcine. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, la sequenza che è il complemento inverso di miRNA è fiancheggiata sul lato 5' e sul lato 3' da strutture a forcina. Inibitori micro-RNA, quando doppio filamento, possono includere appaiamenti errati tra nucleotidi su filamenti opposti. Inoltre, inibitori micro-RNA possono essere legati a frazioni caratteristiche coniugate al fine di facilitare l'assorbimento dell'inibitore in una cellula. Ad esempio, un inibitore micro-RNA può essere legato al colesteril 5-(bis(4-metossifenil)(fenil)metossi)-3 idrossipentilcarbammato) che consente l'assorbimento passivo di un inibitore micro-RNA in una cellula. Inibitori micro-RNA inclusi inibitori miRNA a forcina sono descritti in dettaglio in Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13: 723-730 (2007) e in WO 2007/095387 e WO 2008/036825. Un esperto ordinario nella tecnica può selezionare una sequenza dalla banca dati per un miRNA desiderato e progettare un inibitore utile per i metodi descritti qui.

Adattatore U1

L'adattatore U1 inibisce i siti di poliA e sono oligonucleotidi bifunzionali con un dominio bersaglio complementare a un sito

M104.D1.SM.1DE

nell'esone terminale del gene bersaglio e un 'dominio U1' che si lega al componente RNA nucleare più piccolo U1 del snRNP di U1 (Goracznik, et al., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257-263. snRNP di U1 è un complesso ribonucleoproteico che funziona principalmente per indirizzare le fasi precoci della formazione di spliceosoma mediante legame al limite esone-introne pre-mRNA (Brown and Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49:77-95). I nucleotidi 2-11 dell'estremità 5' della coppia di basi di snRNA di U1 si legano con i 5' del pre mRNA. In una forma di realizzazione, gli oligonucleotidi descritti nella presente sono adattatori U1. In una forma di realizzazione, l'adattatore U1 può essere somministrato in combinazione con almeno un altro agente di iRNA.

Modificazioni oligonucleotidiche

Oligonucleotidi non modificati possono essere inferiori rispetto a quanto ottimale in alcune applicazioni, ad esempio, oligonucleotidi non modificati possono essere soggetti a degradazione, ad esempio, mediante nucleasi cellulari. Le nucleasi possono idrolizzare legami fosfodiesterici di acido nucleico. Tuttavia, le modificazioni chimiche di oligonucleotidi possono conferire proprietà migliorate e, ad esempio, possono rendere gli oligonucleotidi più stabili alle nucleasi.

Poiché gli oligonucleotidi sono polimeri di subunità o monomeri, molte delle modificazioni descritte di seguito avvengono nella posizione uno che è ripetuta all'interno di un oligonucleotide, ad esempio, una modificazione di una base, di uno zucchero, di una

M104.D1.SM.1DE

frazione caratteristica fosfato, o l'ossigeno non a ponte di una frazione caratteristica fosfato. Non è necessario che tutte le posizioni in un dato oligonucleotide siano uniformemente modificate e di fatto più di una delle modificazioni sopra citate può essere incorporata in un singolo oligonucleotide o anche su un singolo oligonucleoside all'interno di un oligonucleotide.

In alcuni casi, la modificazione avverrà su tutte le posizioni in oggetto nell'oligonucleotide ma, in molti e di fatto nella maggior parte dei casi non avverrà. A scopo esemplificativo, una modificazione può avvenire soltanto in una posizione 3' o 5' terminale, può avvenire soltanto nella regione interna, può avvenire soltanto in una regione terminale, ad esempio, in una posizione su un nucleotide terminale o negli ultimi 2, 3, 4, 5, o 10 nucleotidi di un oligonucleotide. Una modificazione può avvenire in una regione a doppio filamento, in una regione a singolo filamento o in entrambe.

Una modificazione può avvenire soltanto nella regione a doppio filamento di un oligonucleotide a doppio filamento o può avvenire soltanto in una regione a singolo filamento di un oligonucleotide a doppio filamento, ad esempio, una modificazione fosforotioato su una posizione dell'ossigeno non a ponte può soltanto avvenire su uno o entrambi i terminali, può avvenire soltanto in una regione terminale, ad esempio, una posizione su un nucleotide terminale o negli ultimi 2, 3, 4, 5 o 10 nucleotidi di un filamento, o può avvenire in regioni a doppio filamento e a singolo filamento, in particolare sui terminali. L'estremità o le estremità in 5' possono essere

M104.D1.SM.1DE

fosforilate.

Una modificazione descritta qui può essere l'unica modificazione o il solo tipo di modificazione inclusa su molteplici nucleotidi, o una modificazione può essere combinata con una o più altre modificazioni descritte qui. Le modificazioni descritte qui possono anche essere combinate su un oligonucleotide, ad esempio, diversi nucleotidi di un oligonucleotide aventi diverse modificazioni descritte qui.

In alcune forme di realizzazione, è particolarmente preferito, ad esempio, aumentare la stabilità così da includere particolari nucleobasi nelle sporgenze o includere nucleotidi modificati o surrogati nucleotidici in sporgenze a singolo filamento, ad esempio, in una sporgenza 5' o 3' o in entrambe. Ad esempio, può essere auspicabile includere nucleotidi purinici nelle sporgenze. In alcune forme di realizzazione, tutte o alcune basi nella sporgenza 3' o 5' saranno modificate, ad esempio, con una modificazione descritta qui. Le modificazioni possono includere, ad esempio, l'uso di modificazioni sul gruppo OH in 2' nello zucchero ribosio, ad esempio, l'uso di deossiribonucleotidi, ad esempio, deossitimidina, al posto di ribonucleotidi, e modificazioni nel gruppo fosfato, ad esempio, modificazioni fosfotioato. Le sporgenze non devono essere omologhe con la sequenza bersaglio.

Modificazioni specifiche sono descritte in maggior dettaglio di seguito.

Il gruppo fosfato

M104.D1.SM.1DE

Il gruppo fosfato è una specie di carica negativa. La carica è distribuita equamente sui due atomi di ossigeno non a ponte. Tuttavia il gruppo fosfato può essere modificato sostituendo uno degli ossigeni con un diverso sostituito. Un risultato di questa modificazione degli scheletri fosfato di RNA può essere la resistenza aumentata dell'oligoribonucleotide alla disgregazione nucleotidica. Pertanto, senza voler essere vincolati dalla teoria, può essere desiderabile in alcune forme di realizzazione introdurre alterazioni che determinano o un legante o linker senza carica o un legante o linker con carica con distribuzione della carica asimmetrica.

Esempi dei gruppi fosfato modificati includono fosforotioato, fosforoselenati, borano fosfati, borano fosfato esteri, idrogeno fosfonati, fosforoamidati, alchil o aril fosfonati e fosfotriesteri. In alcune forme di realizzazione, uno degli atomi di ossigeno fosfato non a ponte nella frazione caratteristica dello scheletro fosfato può essere sostituito mediante uno qualsiasi dei seguenti: S, Se, BR₃ (R è idrogeno, alchile, arile), C (ossia, un gruppo alchile, un gruppo arile, ecc...), H, NR₂ (R è idrogeno, alchile, arile), o OR (R è alchile o arile). L'atomo di fosforo in un gruppo fosfato non modificato è achirale. Tuttavia, la sostituzione di uno degli ossigeni non a ponte con uno dei suddetti atomi di carbonio o gruppi di atomi rende chirale l'atomo di fosforo; in altri termini, un atomo di fosforo in un gruppo fosfato modificato in questo modo è un centro stereogenico. L'atomo di fosforo stereogenico può possedere o la configurazione "R" (qui Rp) o la configurazione "S" (qui Sp).

M104.D1.SM.1DE

I fosforoditioati hanno entrambi gli atomi di ossigeno non a ponte sostituiti dallo zolfo. Il centro del fosforo nei fosforoditioati è achirale, il che preclude la formazione di diastereomeri oligoribonucleotidici. Pertanto, senza voler essere vincolati dalla teoria, modificazioni a entrambi gli ossigeni non a ponte che eliminano il centro chirale, ad esempio, la formazione di fosforoditioati, può essere auspicabile per il fatto che essi non possono produrre miscele diastereomeriche. Pertanto, gli atomi di ossigeno non a ponte possono essere indipendentemente uno qualsiasi tra S, Se, B, C, H, N, o OR (R è alchile o arile).

Il legante fosfato può anche essere modificato dalla sostituzione dell'ossigeno a ponte (ossia ossigeno che lega il fosfato al nucleoside), con azoto (fosforoamidati a ponte), zolfo (fosforotioati a ponte) e carbonio (metilfosfonati a ponte). La sostituzione può avvenire su uno degli atomi di ossigeno di legame o su entrambi gli atomi di ossigeno di legame. Quando l'ossigeno di legame e l'ossigeno 3' di un nucleoside, la sostituzione col carbonio è preferita. Quando l'atomo di ossigeno a ponte è l'atomo di ossigeno in 5' del nucleoside, la sostituzione con azoto è preferita.

Sostituzione del gruppo fosfato

Il gruppo fosfato può essere sostituito da connettori non contenenti fosforo. Senza voler essere vincolati dalla teoria si ritiene che poiché il gruppo fosfodiesterico carico sia il centro di reazione nella degradazione nucleolitica, la sua sostituzione con mimetici strutturali neutri dovrebbe conferire stabilità nucleasica

M104.D1.SM.1DE

potenziata. Nuovamente, senza voler essere vincolati dalla teoria, può essere auspicabile, in alcune forme di realizzazione, introdurre alterazioni in cui il gruppo fosfato carico è sostituito da una frazione caratteristica neutra.

Esempi di frazioni caratteristiche che possono sostituire il gruppo fosfato includono metil fosfonato, idrossilammino, silossano, carbonato, carbossimetil carbammato, ammidi, tioetere, linker etilen ossido, solfonato, solfonammide, tioformacetale, formacetale, ossima, metilenimmino, metilenmetilimmino, metilenidrazo, metilendimetilidrazo e metilenossimetilimmino. Sostituzioni preferite includono i gruppi metilencarbonilammino e metilenmetilimmino.

Legami fosfato modificati in cui almeno uno degli ossigeni legati al fosfato è stato sostituito o il gruppo fosfato è stato sostituito da un gruppo non fosforo, sono anche indicati come "legame dello scheletro non fosfodiesteri".

Sostituzione dello scheletro ribofosfato

Impalcature che imitano oligonucleotidi possono anche essere costruiti in cui il legante fosfato e lo zucchero ribosio sono sostituiti da surrogati nucleosidici o nucleotidici resistenti alle nucleasi. Senza voler essere vincolati dalla teoria, si ritiene che l'assenza di uno scheletro caricato ripetutamente diminuisca il legame alle proteine che riconoscono i polianioni (ad esempio nucleasi). Nuovamente, senza voler essere vincolati dalla teoria può essere auspicabile in alcune forme di realizzazione introdurre alterazioni in cui le basi sono attaccate da uno scheletro surrogato

M104.D1.SM.1DE

neutro. Esempi includono i surrogati morfolino, ciclobutile, pirrolidina e acido nucleico peptidico (PNA). Un surrogato preferito è un surrogato di PNA.

Modificazioni terminali

Le estremità 3' e 5' di un oligonucleotide possono essere modificate. Tali modificazioni possono essere sull'estremità 3', l'estremità 5' o entrambe l'estremità della molecola. Esse possono includere modificazione o sostituzione di un intero fosfato terminale o di uno o più degli atomi del gruppo fosfato. Ad esempio, le estremità 3' e 5' di un oligonucleotide possono essere coniugate ad altre entità molecolari funzionali quali frazioni caratteristiche di marcatura, ad esempio, fluorofori (ad esempio, pirene, TAMRA, fluoresceina, coloranti Cy3 o Cy5) o gruppi protettori (a base ad esempio, di zolfo, silice, boro o estere). Le entità molecolari funzionali possono essere attaccate allo zucchero attraverso un gruppo fosfato o un linker. L'atomo terminale del legante può connettersi o sostituire l'atomo di legame del gruppo fosfato o il gruppo C-3' o C-5' O, N, S o C dello zucchero. In alternativa, il linker può connettersi a o sostituire l'atomo terminale di un surrogato nucleotidico (ad esempio, PNA).

Quando un array legante/fosfato-entità molecolare funzionale-legante/fosfato è interposto tra due filamenti di un dsRNA, questo array può sostituire un'ansa di RNA forcina in un agente di RNA del tipo a forcina.

Modificazioni terminali utili per modulare l'attività includono

M104.D1.SM.1DE

modificazioni dell'estremità 5' con fosfato o analoghi di fosfato. Ad esempio, in forme di realizzazione preferite, filamenti antisenso di dsRNA, sono 5' fosforilati o includono un analogo fosforile sul terminale 5'. Modificazioni 5'-fosfato includono quelle che sono compatibili con il silenziamento genico mediato da RISC. Modificazioni adeguate includono: 5'-monofosfato ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protezione 5'-guanosina (7-metilata o non-metilata) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protezione 5'-adenosina (A_{ppp}), e qualsiasi struttura di protezione nucleotidica modificata o non modificata (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)₂(O)P-S-5'); qualsiasi combinazione aggiuntiva di monofosfato, difosfato e trifosfati sostituiti da ossigeno/zolfo (ad esempio 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, ecc.), 5'-fosforamidati ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5'), 5'-alchil-fosfonati (R=alchil=metile, etile, isopropile, propile, ecc., ad esempio RP(OH)(O)-O-5'-, (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-alchileterfosfonati (R=alchiletere=metossimetile (MeOCH₂-), etossimetile, ecc., ad esempio RP(OH)(O)-O-5'-).

Modificazioni terminali possono anche essere utili per monitorare la distribuzione e in tali casi i gruppi preferiti da aggiungere includono fluorofori, ad esempio, fluoresceina o un colorante Alexa, ad esempio, Alexa 488. Modificazioni terminali possono anche essere utili per potenziare l'assorbimento,

M104.D1.SM.1DE

modificazioni utili per ciò includono colesterolo. Modificazioni terminali possono anche essere utili per reticolare un agente di RNA a un'altra frazione caratteristica, modificazioni utili per ciò includono mitomicina C.

Nucleobasi

Adenina, guanina, citosina e uracile sono le basi più comuni che si trovano nell'RNA. Queste basi possono essere modificate o sostituite per fornire RNA aventi proprietà migliorate. Ad esempio, oligoribonucleotidi resistenti a nucleasi possono essere preparati con queste basi e con nucleobasi sintetiche e naturali (ad esempio, inosina, timina, xantina, ipoxantina, nubularina, isoguanisina, o tubercidina) e una qualsiasi delle suddette modificazioni. In alternativa, analoghi sostituiti o modificati di una qualsiasi delle suddette basi, ad esempio, "basi inconsuete", "basi modificate", "basi non naturali" e "basi universali" descritti qui possono essere impiegati. Esempi includono, senza limitazione, 2-amminoadenina, 6-metile e altri derivati alchile di adenina e guanina, 2-propile e altri derivati alchile di adenina e guanina, 5-alouracile e citosina, 5-propinil uracile e citosina, 6-azo uracile, citosina e timina, 5-uracile (pseudouracile), 4-tiouracile, 5-alouracile, 5-(2-amminopropil)uracile, 5-ammino allil uracile, 8-alo, ammino, tiolo, tioalchile, ossidrile e altre adenine e guanine 8-sostituite, 5-trifluorometile e altri uracili e citosine 5-sostituiti, 7-metilguanina, pirimidine 5-sostituite, 6-azapirimidine e purine N-2, N-6 e O-6 sostituite, inclusa 2-amminopropiladenina, 5-

M104.D1.SM.1DE

propiniluracile e 5-propinilcitosina, diidrouracile, 3-deaza-5-azacitosina, 2-amminopurina, 5-alchiluracile, 7-alchilguanina, 5-alchil citosina, 7-deazaadenina, N6, N6-dimetiladenina, 2,6-diamminopurina, 5-ammino-allil-uracile, N3-metiluracile, 1,2,4-triazoli sostituiti, 2-piridinone, 5-nitroindolo, 3-nitropirrolo, 5-metossiuracile, acido uracil-5-ossiacetico, 5-metossicarbonil-metiluracile, 5-metil-2-tiouracile, 5-metossicarbonilmetil-2-tiouracile, 5-metilamminometil-2-tiouracile, 3-(3-amino-3-carbossipropil)uracile, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁴-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, N-metilguanine, o basi di O-alchilate. Ulteriori purine e pirimidine includono quelle descritte nel brevetto U.S. n. 3.687.808, quelle descritte in Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pagg. 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, e quelle descritte da Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613.

Gruppi cationici

Modificazioni a oligonucleotidi possono anche includere l'attacco di uno o più gruppi cationici allo zucchero, alla base e/o all'atomo di fosforo di un fosfato o di una frazione caratteristica dello scheletro fosfato modificato. Un gruppo cationico può essere attaccato a qualsiasi atomo in grado di effettuare una sostituzione su una base naturale, inconsueta o universale. Una posizione preferita è una che non interferisce con l'ibridazione, ossia non interferisce con le interazioni dei legami idrogeno necessari per

M104.D1.SM.1DE

l'appaiamento delle basi. Un gruppo cationico può essere attaccato, ad esempio, attraverso la posizione C2' di uno zucchero o posizione analoga in un surrogato dello zucchero ciclico o aciclico. Gruppi cationici possono includere ad esempio, gruppi amminici protonati, derivati ad esempio, da O-AMMINA (AMMINA = NH₂; alchilammino, dialchilammino, eterociclicile, arilammino, diaril ammino, eteroaril ammino, o dieteroaril ammino, etilen diammina, poliammino); aminoalcooli, ad esempio, O(CH₂)_nAMMINA, (ad esempio, AMMINA = NH₂; alchilammino, dialchilammino, eterociclicile, arilammino, diaril ammino, eteroaril ammino, o dieteroaril ammino, etilen diammina, poliammino); ammino (ad esempio NH₂; alchilammino, dialchilammino, eterociclicile, arilammino, diaril ammino, eteroaril ammino, dieteroaril ammino, o aminoacido); o NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMMINA (AMMINA = NH₂; alchilammino, dialchilammino, eterociclicile, arilammino, diaril ammino, eteroaril ammino, o dieteroaril ammino).

Posizionamento all'interno di un oligonucleotide

Alcune modificazioni possono preferibilmente essere incluse su un oligonucleotide in una particolare posizione, ad esempio, in una posizione interna di un filamento o sull'estremità 5' o 3' di un oligonucleotide. Una posizione preferita di una modificazione su un oligonucleotide può conferire proprietà preferite sull'agente. Ad esempio, posizioni preferite di particolari modificazioni possono conferire proprietà di silenziamento genico ottimali o resistenza aumentata all'attività endonucleasica o esonucleasica.

Uno o più nucleotidi di un oligonucleotide possono avere un

M104.D1.SM.1DE

legame 2'-5'. Uno o più nucleotidi di un oligonucleotide possono avere legami invertiti, ad esempio legami 3'-3', 5'-5', 2'-2' o 2'-3'.

Un oligonucleotide a doppio filamento può includere almeno una dinucleotide 5'-uridina-adenina-3' (5'-UA-3') in cui l'uridina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-uridina-guanina-3' (5'-UG-3') terminale, in cui la 5'-uridina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-citidina-adenina-3' (5'-CA-3') terminale, in cui la 5'-citidina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-uridina-uridina-3' (5'-UU-3') terminale, in cui la 5'-uridina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-citidina-citidina-3' (5'-CC-3') terminale, in cui la 5'-citidina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-citidina-uridina-3' (5'-CU-3') terminale, in cui la 5'-citidina è un nucleotide 2'-modificato, o un dinucleotide 5'-uridina-citidina-3' (5'-UC-3') terminale, in cui la 5'-uridina è un nucleotide 2'-modificato. Oligonucleotidi a doppio filamento comprendenti queste modificazioni sono particolarmente stabilizzati contro l'attività endonucleasica.

Riferimenti generali

Gli oligoribonucleotidi e oligoribonucleosidi usati qui possono essere sintetizzati con la sintesi in fase solida, si veda ad esempio "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (in particolare Capitolo 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Capitolo 2, Oligoribonucleotide synthesis, Capitolo 3, 2'-

M104.D1.SM.1DE

O-Methyloligoribonucleotide- s: synthesis and applications, Capitolo 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Capitolo 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Capitolo 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, e Capitolo 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Altre procedure, reagenti, gruppi di blocco e condizioni di reazione particolarmente utili sono descritti in Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 486-504; Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2223-2311 e Beaucage, S.L. e Iyer, R.P., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 6123-6194, o i riferimenti indicati in essi. La modificazione descritta in WO 00/44895, WO 01/75164, o WO 02/44321 può essere usata qui.

Riferimenti del gruppo fosfato

La preparazione di oligoribonucleotidi fosfinato è descritta nel brevetto U.S. n. 5.508.270. La preparazione di oligoribonucleotidi alchil fosfonato è descritta nel brevetto U.S. n. 4.469.863. La preparazione di oligoribonucleotidi fosforamidite è descritta nel brevetto U.S. n. 5.256.775 o nel brevetto U.S. n. 5.366.878. La preparazione di oligoribonucleotidi fosfotriestere è descritta nel brevetto U.S. n. 5.023.243. La preparazione di oligoribonucleotide boran fosfato è descritta nei brevetti U.S. n. 5.130.302 e 5.177.198. La preparazione di oligoribonucleotidi 3'-deossi-3'-ammino fosforamidato è descritta nel brevetto U.S. n. 5.476.925. Oligoribonucleotidi 3'-deossi-3'-metilenfosfonato sono descritti in An, H, et al. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2789-2801. La preparazione di nucleotidi a ponte di zolfo è descritta in Sproat et al. *Nucleosides*

M104.D1.SM.1DE

Nucleotides **1988**, 7,651 e Crosstick et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4693.

Riferimenti del gruppo zucchero

Le modificazioni alle modificazioni 2' possono essere trovate in Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 99-134 e tutti i riferimenti in esso. Modificazioni specifiche al ribosio possono essere trovate nei seguenti riferimenti: 2'-fluoro (Kawasaki et. al., *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 301-310).

Riferimenti per la sostituzione del gruppo fosfato

Oligoribonucleosidi metilenmetilimmino legati, anche identificati qui come oligoribonucleosidi MMI legati, oligoribonucleosidi metilendimetilidrazo legati, identificati qui anche come oligoribonucleosidi MDH legati, e oligonucleosidi metilencarbonilammino legati, identificati qui anche come oligoribonucleosidi ammido-3 legati, e oligonucleosidi metilenammino-carbonile legati, identificati anche qui come oligo-ribonucleosidi ammido-4 legati nonché composti a scheletro misti aventi, ad esempio, legami MMI e PO o PS alternati, possono essere preparati come descritto nei brevetti U.S. n. 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677 e nelle domande PCT pubblicate PCT/US92/04294 e PCT/US92/ 04305 (pubblicate come WO 92/20822 e WO 92/20823, rispettivamente). Oligoribonucleosidi formacetale e tioformacetale legati possono essere preparati come descritto nei brevetti U.S. n. 5.264.562 e

M104.D1.SM.1DE

5.264.564. Oligoribonucleosidi etilen ossido legati possono essere preparati come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.223.618. Sostituzioni silossano sono descritte in Cormier J.F. *et al. Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4583. Sostituzioni carbonato sono descritte in Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* **1971**, 1933. Sostituzioni carbossimetile sono descritte in Edge, M.D. *et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1972**, 1991. Sostituzioni carbammato sono descritte in Stirchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, *17*, 6129.

Riferimenti per la sostituzione dello scheletro fosfato-ribosio

Composti surrogati dello zucchero ciclobutile possono essere preparati come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.359.044. Un surrogato dello zucchero pirrolidina può essere preparato come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.519.134. Surrogati dello zucchero morfolino possono essere preparati come è descritto nei brevetti U.S. n. 5.142.047 e 5.235.033, e altre descrizioni di brevetto correlate. Acidi nucleici peptidici (PNA) sono di per sé noti e possono essere preparati secondo una qualsiasi delle varie procedure indicate in *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, *4*, 5-23. Essi possono anche essere preparati secondo il brevetto U.S. n. 5.539.083.

Riferimenti per la modificazione terminale

Modificazioni terminali sono descritte in Manoharan, M. *et al. Antisense and Nucleic Acid Drug Development* *12*, 103-128 (2002) e nei riferimenti in esso.

Riferimenti per le nucleobasi

M104.D1.SM.1DE

Purina nucleoside amiditi N-2 sostituite possono essere preparate come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.459.255. 3-deaza purina nucleoside amiditi possono essere preparate come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.457.191. Pirimidina nucleoside amiditi 5,6-sostituite possono essere preparate come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.614.617. 5-propinil pirimidina nucleoside amiditi possono essere preparate come è descritto nel brevetto U.S. n. 5.484.908.

Legante o linker

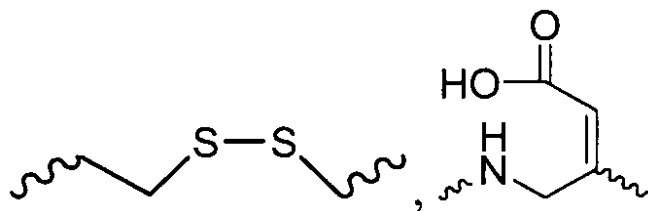
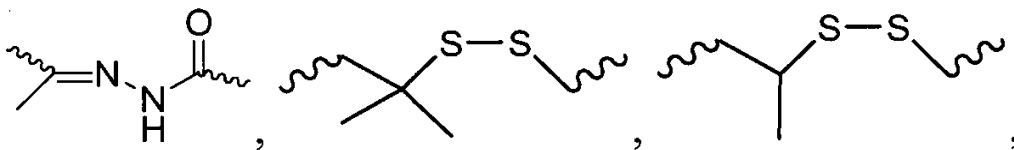
Il termine "legante" o "linker" indica una frazione caratteristica organica che connette due parti di un composto. I linker tipicamente comprendono un legame diretto o un atomo quale ossigeno o zolfo, una unità quale NR^1 , $C(O)$, $C(O)NH$, SO , SO_2 , SO_2NH o una catena di atomi, quale alchile sostituito o non sostituito, alchenile sostituito o non sostituito, alchinile sostituito o non sostituito, arilalchile, arilalchenile, arilalchinile, eteroarilalchile, eteroarilalchenile, eteroarilalchinile, eterociclilalchile, eterociclilalchenile, eterociclilalchinile, arile, eteroarile, eterociclile, cicloalchile, cicloalchenile, alchilarilalchile, alchilarilalchenile, alchilarilalchinile, alchenilarilalchile, alchenilarilalchenile, alchenilarilalchinile, alchinarilalchile, alchinarilalchenile, alchinarilalchinile, alchileteroarilalchile, alchileteroarilalchenile, alchileteroarilalchinile, alchenileteroarilalchile, alchenileteroarilalchenile, alchenileteroarilalchinile, alchileterociclilalchile, alchileterociclilalchenile, alchileterociclilal-

M104.D1.SM.1DE

alchinile, alchenileterocicclilalchile, alchenileterocicclilalchenile, alchenileterocicclilalchinile, alchinileterocicclilalchile, alchinileterocicclilalchenile, alchilarile, alchenilarile, alchinarile, alchileteroarile, alchenileteroarile, alchinileteroarile, in cui uno o più metileni possono essere interrotti o terminati da O, S, S(O), SO₂, N(R¹)₂, C(O), il gruppo di legame scindibile, arile sostituito o non sostituito, eteroarile sostituito o non sostituito, eterociclico sostituito o non sostituito; in cui R¹ è idrogeno, acile, alifatico o alifatico sostituito.

In una forma di realizzazione, il legante è $-(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_{q'}]_q-T-$, in cui:

P, R, T, P', R' e T sono ognuno assente indipendentemente per ogni occorrenza, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CH=N-O,



o eterocicclile;

Q e Q' sono ognuno indipendentemente assente per ogni occorrenza, $-(CH_2)_n-$, $-C(R^1)(R^2)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n C(R^1)(R^2)-$, $-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2-$, o $-(CH_2CH_2O)_m CH_2CH_2NH-$;

M104.D1.SM.1DE

X è assente o un gruppo di legame scindibile;

R^a è H o una catena laterale amminoacidica;

R^1 ed R^2 sono indipendentemente per ogni occorrenza H, CH_3 , OH, SH
 o $N(R^N)_2$;

R^N è indipendentemente per ogni occorrenza H, metile, etile,
 propile, isopropile, butile o benzile;

q, q' e q'' sono ognuno indipendentemente per ogni occorrenza 0-
 20 e in cui l'unità di ripetizione può essere uguale o diversa;

n è indipendentemente per ogni occorrenza 1-20; e

m è indipendentemente per ogni occorrenza 0-50.

In una forma di realizzazione, il legante comprende almeno un
 gruppo di legame scindibile.

In alcune forme di realizzazione, il legante è un legante
 ramificato. Il punto di ramificazione del legante ramificato può
 essere almeno trivalente ma può essere un atomo tetraivalente,
 pentavalente o esavalente, o un gruppo che presenta tali molteplici
 valenze. In alcune forme di realizzazione, il punto di ramificazione
 è, -N, -N(Q)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C,
 -N(Q)C(O)-C, o -N(Q)C(O)O-C; in cui Q è indipendentemente per ogni
 occorrenza H o alchile opzionalmente sostituito. In un'altra forma di
 realizzazione, il punto di ramificazione è glicerolo o un derivato di
 glicerolo.

Gruppi di legame scindibili

Un gruppo di legame scindibile è uno che è sufficientemente
 stabile all'esterno della cellula, tuttavia che in seguito

M104.D1.SM.1DE

all'ingresso in una cellula bersaglio è scisso per lasciare le due parti che il legante tiene insieme. In una forma di realizzazione preferita, il gruppo di legame scindibile è scisso almeno 10 volte o più, preferibilmente almeno 100 volte più rapidamente nella cellula bersaglio o in una prima condizione di riferimento (che può, ad esempio, essere selezionata per imitare o rappresentare condizioni intracellulari) rispetto all'interno del sangue di un soggetto o in una seconda condizione di riferimento (che può, ad esempio, essere selezionata per imitare o rappresentare le condizioni trovate nel sangue o nel siero).

Gruppi di legame scindibili sono suscettibili ad agenti di scissione, ad esempio, pH, potenziale redox, o la presenza di molecole degradative. In generale, agenti di scissione sono più prevalenti o si trovano a livelli o attività superiori all'interno della cellula rispetto a quando nel siero o nel sangue. Esempi di tali agenti degradativi includono agenti redox che sono selezionati per particolari substrati o che non hanno specificità per il substrato inclusi, ad esempio, enzimi ossidativi o riduttivi o agenti riduttivi quali mercaptani, presenti nelle cellule, che possono degradare un gruppo di legame scindibile redox mediante riduzione, esterasi, endosomi o agenti che possono creare un ambiente acido, ad esempio, quelli che determinano un pH di cinque o meno; enzimi che possono idrolizzare o degradare un gruppo di legame scindibile acido, agendo come acido generale, peptidasi (che possono essere specifiche per il substrato) e fosfatasi.

M104.D1.SM.1DE

Un gruppo di legame scindibile, quale un legame disolfuro può essere suscettibile al pH. Il pH di siero umano è 7,4, mentre il pH intracellulare medio è leggermente inferiore, variando da circa 7,1 a 7,3. Endosomi hanno un pH più acido nell'intervallo di 5,5-6,0, e lisosomi hanno un pH ancora più acido a circa 5,0. Alcuni linker avranno un gruppo di legame scindibile che è stato scisso a un pH preferito, rilasciando così il lipide cationico dal ligando all'interno della cellula o nel compartimento desiderato della cellula.

Un legante può includere un gruppo di legame scindibile che è scindibile mediante un particolare enzima. Il tipo di gruppo di legame scindibile incorporato in un linker può dipendere dalla cellula a cui mirare. Ad esempio, ligandi di bersagliamento epatico possono essere legati ai lipidi cationici tramite un legante che include un gruppo estere. Cellule epatiche sono ricche di esterasi e pertanto il legante sarà essere scisso più efficientemente in cellule epatiche rispetto a tipi di cellule che non sono ricchi di esterasi. Altri tipi di cellule ricche di esterasi includono cellule polmonari, della corteccia renale e dei testicoli.

Leganti che contengono legami peptidici possono essere usati durante il bersagliamento di tipi di cellule ricche di peptidasi quali le cellule epatiche e sinoviociti.

In generale, l'adeguatezza di un gruppo di legame scindibile candidato può essere valutata testando la capacità di un agente degradativo (o condizione) a scindere il gruppo di legame candidato.

M104.D1.SM.1DE

Sarà anche desiderabile testare anche il gruppo di legame scindibile candidato per la capacità a resistere alla scissione nel sangue o quando a contatto con altro tessuto non bersaglio. Pertanto è possibile determinare la suscettibilità relativa alla scissione tra una prima e una seconda condizione in cui la prima è selezionata come indicativa di una scissione in una cellula bersaglio e la seconda è selezionata come indicativa della scissione in altri tessuti o fluidi biologici, ad esempio, sangue o siero. Le valutazioni possono essere eseguite in sistemi privi di cellule, in cellule, in coltura cellulare, in coltura organica o tissutale o in animali interi. Può essere utile effettuare valutazioni iniziali in condizioni prive di cellule o di coltura e confermare con ulteriore valutazione in animali interi. In forme di realizzazione preferite, i composti candidato utili sono scissi almeno 2, 4, 10 o 100 volte più rapidamente nella cellula (o in condizioni in vitro selezionate per imitare le condizioni intracellulari) rispetto al sangue o al siero (o in condizioni in vitro selezionate per imitare le condizioni extracellulari).

Gruppi di legame scindibili redox

Una classe di gruppi di legame scindibili sono gruppi di legame scindibili redox che sono scissi in seguito alla riduzione o ossidazione. Un esempio di gruppo di legame scindibile in modo riduttivo è un gruppo di legame disolfuro (-S-S-). Per determinare se un gruppo di legame scindibile candidato è un "gruppo di legame scindibile in modo riduttivo" adeguato, o ad esempio è adeguato per

M104.D1.SM.1DE

l'uso con una particolare frazione caratteristica iRNA e un particolare agente di bersagliamento, è possibile osservare i metodi descritti qui. Ad esempio, un candidato può essere valutato mediante incubazione con ditiotreitolo (DTT), o altro agente riducente, usando reagenti noti nella tecnica che imitano la velocità di scissione che si osserverebbe in una cellula, ad esempio, una cellula bersaglio. I candidati possono anche essere valutati in condizioni che sono selezionate per imitare le condizioni del sangue o del siero. In una forma di realizzazione preferita, i composti candidato sono scissi di al massimo 10% nel sangue. In forme di realizzazione preferite, composti candidato utili sono degradati almeno 2, 4, 10 o 100 volte più rapidamente nella cellula (o in condizioni in vitro selezionate per imitare le condizioni intracellulari) rispetto al sangue (o in condizioni in vitro selezionate per imitare condizioni extracellulari). La velocità di scissione di composti candidato può essere determinata usando saggi cinetici enzimatici standard in condizioni selezionate per imitare i terreni intracellulari e rispetto a condizioni selezionate per imitare i terreni extracellulari.

Gruppi di legame scindibili a base di fosfato

Gruppi di legame scindibili a base di fosfato sono scissi da agenti che degradano o idrolizzano il gruppo fosfato. Un esempio di un agente che scinde gruppi fosfato in cellule sono enzimi quali fosfatasi in cellule. Esempi di gruppi di legame a base di fosfato sono -O-P(O) (ORk)-O-, -O-P(S) (ORk)-O-, -O-P(S) (SRk)-O-, -S-P(O) (ORk)-O-,

M104.D1.SM.1DE

$-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$,
 $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $S-P(S)(Rk)-O-$,
 $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. Forme di realizzazione preferite sono
 $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$,
 $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$,
 $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$,
 $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Una forma di realizzazione è
 $-O-P(O)(OH)-O-$. Questi candidati possono essere valutati usando
 metodi analoghi a quelli sopra descritti.

Gruppi di legame scindibili in acido

Gruppi di legame scindibili in acido sono gruppi di legame che sono scissi in condizioni acide. In forme di realizzazione preferite, gruppi di legame scindibili in acido sono scissi in un ambiente acido con un pH di circa 6,5 o meno (ad esempio, circa 6,0, 5,5, 5,0 o meno, o da agenti quali enzimi che possono agire come acido generale. In una cellula, organelli a pH ridotto specifico quali endosomi e lisosomi possono fornire un ambiente di scissione per gruppi di legame scindibili in acido. Esempi di gruppi di legame scindibili in acido includono, senza limitazione, idrazoni, esteri, ed esteri di amminoacidi. Gruppi di scissione in acido possono avere la formula generale $-C=NN-$, $C(O)O$, o $-OC(O)$. Una forma di realizzazione preferita è quando il carbonio attaccato all'ossigeno dell'estere (il gruppo alcossi) è un gruppo arile, gruppo alchile sostituito, o gruppo alchile terziario quale dimetil pentile o t-butile. Questi candidati possono essere valutati usando metodi analoghi a quelli

M104.D1.SM.1DE

sopra descritti.

Gruppi di legame a base estere

Gruppi di legame scindibili a base estere sono scissi da enzimi quali esterasi e amidasi in cellule. Esempi di gruppi di legame scindibili a base estere includono, senza limitazione, esteri di gruppi alchilene, alchenilene e alchinilene. Gruppi di legame scindibili in estere hanno la formula generale $-C(O)O-$, o $-OC(O)-$. Questi candidati possono essere valutati usando metodi analoghi a quelli sopra descritti.

Gruppi di scissione a base di peptide

Gruppi di legame scindibili a base di peptide sono scissi da enzimi quali peptidasi o proteasi in cellule. Gruppi di legame scindibili a base di peptide sono legami peptidici formati tra amminoacidi per fornire oligopeptidi (ad esempio, dipeptidi, tripeptidi ecc.) e polipeptidi. Gruppi scindibili a base di peptide non includono il gruppo ammidico ($-C(O)NH-$). Il gruppo ammidico può essere formato tra qualsiasi alchilene, alchenilene o alchinilene. Un legame peptidico è un tipo speciale di legame ammidico formato tra amminoacidi per fornire peptidi e proteine. Un gruppo di scissione a base di peptide è generalmente limitato al legame peptidico (ossia, il legame ammidico) formato tra amminoacidi che forniscono peptidi e proteine e non include l'intero gruppo funzionale ammidico. Gruppi di legame scindibili a base di peptide hanno la formula generale $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$, in cui R^A ed R^B sono i gruppi R dei due amminoacidi adiacenti. Questi candidati possono essere valutati

M104.D1.SM.1DE

usando metodi analoghi a quelli sopra descritti.

Ligandi

Un'ampia varietà di entità può essere accoppiata agli oligonucleotidi e lipidi descritti qui. Frazioni caratteristiche preferite sono ligandi che sono accoppiati, preferibilmente in modo covalente, o direttamente o indirettamente attraverso un attacco intermedio.

In forme di realizzazione preferite, un ligando altera la distribuzione, il bersagliamento o la durata della molecola in cui è incorporato. In forme di realizzazione preferite, un ligando fornisce un'affinità potenziata per un bersaglio selezionato, ad esempio, molecola, cellula o tipo cellulare, compartimento, ad esempio, compartimento cellulare o organico, tessuto, organo o regione dell'organismo come, ad esempio, rispetto a una specie assente quale un ligando. Ligandi che forniscono affinità potenziata per un bersaglio selezionato sono anche denominati ligandi di bersagliamento. Ligandi preferiti per la coniugazione ai lipidi descritti qui sono ligandi di bersagliamento.

Alcuni ligandi possono avere proprietà endosomolitiche. I ligandi endosomolitici favoriscono la lisi dell'endosoma e/o il trasporto della composizione descritta qui o i suoi componenti, dall'endosoma al citoplasma della cellula. Il ligando endosomolitico può essere un peptide polianionico o peptidomimetico che mostra un'attività della membrana pH-dipendente e fusogenicità. In alcune forme di realizzazione, il ligando endosomolitico assume la sua

M104.D1.SM.1DE

conformazione attiva a un pH endosomiale. La conformazione "attiva" è la conformazione in cui il ligando endosomolitico favorisce la lisi dell'endosoma e/o il trasporto della composizione descritta qui o suoi componenti dall'endosoma al citoplasma della cellula. Ligandi endosomolitici esemplificativi includono il peptide GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), il peptide EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:1581-1586), e suoi derivati (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559:56-68). In alcune forme di realizzazione, il componente endosomolitico può contenere un gruppo chimico (ad esempio, un amminoacido) che sarà sottoposto a una variazione di carico o protonazione in risposta a una variazione di pH. Il componente endosomolitico può essere lineare o ramificato. Sequenze primarie esemplificative di ligandi endosomolitici a base di peptide sono mostrate nella Tabella 5.

Tabella 5: elenco di peptidi con attività endosomolitica.

Nome	Sequenza (da N a C)	Rif
GALA	AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AAALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diINF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALEALAAGGSC	6
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EgnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EgnI DG	4

n, norleucina

Riferimenti

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

Ligandi preferiti possono migliorare il trasporto, l'ibridazione e proprietà di specificità e possono anche migliorare la resistenza alle nucleasi dell'oligoribonucleotide naturale o modificato risultante o una molecola polimerica comprendente qualsiasi combinazione di monomeri descritta qui e/o ribonucleotidi naturali o modificati.

Ligandi in generale possono includere modificatori terapeutici,

M104.D1.SM.1DE

ad esempio, per potenziare l'assorbimento; diagnosticare composti o gruppi reporter ad esempio, per monitorare la distribuzione; gli agenti di cross-linking e frazioni caratteristiche che conferiscono resistenza alle nucleasi. Esempi generali includono lipidi, steroidi, vitamine, zuccheri, proteine, peptidi, poliammine e mimetici peptidici.

I ligandi possono includere una sostanza naturale, quale una proteina (ad esempio, siero albumina umana (HSA), lipoproteina a bassa densità (LDL), lipoproteina a elevata densità (HDL) o globulina); un carboidrato (ad esempio, un destrano, pullulano, chitina, chitosano, inulina, ciclodestrina o acido ialuronico); o un lipide. Il ligando può anche essere una molecola ricombinante o sintetica quale un polimero sintetico, ad esempio, un poliammino acido sintetico, un oligonucleotide (ad esempio, un aptamero). Esempi di poliammino acidi includono acido poliamminico, una polilisina (PLL), acido poli L-aspartico, acido poli L-glutammico, copolimero stirene-anidride maleica, copolimero poli(L-lattide-co-glicolide), copolimero divinil etere-anidride maleica, copolimero N-(2-idrossipropil)metacrilammide (HMPA), polietilen glicole (PEG), polivinil alcol (PVA), poliuretano, acido poli(2-etilacrilico), polimeri N-isopropilacrilammide, o polifosfazina. Esempi di poliammine includono: polietilenimina, polilisina (PLL), spermina, spermidina, poliammina, pseudopeptide-poliammina, poliammina peptidomimetica, poliammina dendrimerica, arginina, amidina, protamina, lipide cationico, porfirina cationica, sale quaternario di una poliammina o

M104.D1.SM.1DE

un peptide ad alfa elica.

I ligandi possono anche includere gruppi di bersagliamento, ad esempio, agenti di bersagliamento cellulare o tissutale, ad esempio, lectina, glicoproteina, lipide o proteina, ad esempio, un anticorpo che si lega a un tipo di cellula specifico quale una cellula renale. Un gruppo di bersagliamento può essere una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteina, proteina tensioattiva A, carboidrato mucina, lattosio multivalente, galattosio multivalente, N-acetil-galattosammina, mannosio multivalente N-acetil-glucosammina, fucosio multivalente, poliamminoacidi glicosilati, galattosio multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutammato, poli-aspartato, un lipide, colesterolo, uno steroide, acido bilico, folato, vitamina B12, biotina, un peptide RGD, un mimetico del peptide RGD o un aptamero. La Tabella 6 mostra alcuni esempi di ligandi di bersagliamento e loro recettori associati.

Tabella 6: Ligandi di bersagliamento e loro recettori associati

<u>Cellule epatiche</u>	<u>Ligando</u>	<u>Recettore</u>
1) Cellula parenchimale (PC) (epatociti)	Galattosio	ASGP-R (recettore della asiologlicoproteina)
	Gal Nac (n-acetil-galattosammina)	Recettore di ASPG-R Gal NAc
	Lattosio	
	Asialofetuina	ASPG-r
2) Cellula endoteliale sinusoidale (SEC)	Ialuronano	Recettore dello ialuronano
	Procollagene	Recettore del procollagene
	Molecole di carica negativa	Recettori di scavenger
	Mannosio	Recettori di mannosio
	N-acetil glucosammina	Recettori di scavenger
	Immunoglobuline	Recettore di Fc
	LPS	Recettore di CD14
	Insulina	Transitosi mediata dal recettore
	Transferrina	Transitosi mediata dal recettore
	Albumine	Non specifico
	Coniugati zucchero-albumina	
	Mannosio-6-fosfato	Recettore del mannosio-6-fosfato
3) Cellula di Kupffer (KC)	Mannosio	Recettori del mannosio
	Fucosio	Recettori del fucosio
	Albumine	Non specifico
	Coniugati mannosio-albumina	

Altri esempi di ligandi includono coloranti, agenti intercalanti (ad esempio acridine), reticolanti (ad esempio psoralene, mitomicina C), porfirine (TPPC4, texafirina, Saffirina), idrocarburi aromatici policiclici (ad esempio, fenazina, diidrofenzina), endonucleasi artificiali (ad esempio EDTA), molecole lipofile, ad esempio,

M104.D1.SM.1DE

colesterolo, acido colico, acido acetico adamantano, acido 1-pirene butirrico, diidrotosterone, 1,3-bis-O(esadecil)glicerolo, gruppo geranilossiesile, esadecilglicerolo, borneolo, mentolo, 1,3-propan-diolo, gruppo eptadecile, acido palmitico, acido miristico, acido O3-(oleoil)litocolico, acido O3-(oleoil)colenico, dimetossitritile, o fenossazina) e coniugati peptidici (ad esempio, peptide antennapedia, peptide Tat), agenti alchilanti, fosfato, ammino, mercapto, PEG (ad esempio, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliammino, alchile, alchile sostituito, marker radiomarcati, enzimi, apteni (ad esempio biotina), facilitatori del trasporto/assorbimento (ad esempio, aspirina, vitamina E, acido folico), ribonucleasi sintetica (ad esempio, imidazolo, bisimidazolo, istamina, cluster imidazolici, coniugati acridina-imidazolo, complessi Eu³⁺ di tetraazamacrocicli), dinitrofenile, HRP, o AP.

Ligandi possono essere proteine, ad esempio, glicoproteine, o peptidi, ad esempio, molecole aventi un'affinità specifica per un co-ligando, o anticorpi ad esempio, un anticorpo che si lega a un tipo di cellula specifica quale una cellula cancerosa, cellula endoteliale o cellula ossea. I ligandi possono anche includere ormoni e recettori ormonali. Essi possono anche includere specie non peptidiche quali lipidi, lectine, carboidrati, vitamine, cofattori, lattosio multivalente, galattosio multivalente, N-acetil-galattosammina, mannosio multivalente N-acetil-gulucosammina, fucosio multivalente o aptameri. Il ligando può essere, ad esempio, un lipopolisaccaride, un attivatore di p38 MAP chinasi, o un attivatore di NF- κ B.

M104.D1.SM.1DE

Il ligando può essere una sostanza, ad esempio, un farmaco, che può aumentare l'assorbimento dell'agente iRNA nella cellula, ad esempio, mediante disgregazione del citoscheletro della cellula, ad esempio, disgregando i microtubuli della cellula, microfilamenti e/o filamenti intermedi. Il farmaco può, ad esempio, essere tassone, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazolo, japlachinolide, latrunculina A, falloidina, swinolide A, indanocina, o mioservina.

Il ligando può aumentare l'assorbimento dell'agente di iRNA nella cellula mediante attivazione di una risposta infiammatoria, ad esempio, ligandi esemplificativi che avrebbero un tale effetto includono il fattore alfa di necrosi tumorale (TNFalfa), interleuchina-1 beta, o interferone gamma.

In un aspetto, il ligando è un lipide o una molecola a base di lipide. Tale lipide o una tale molecola a base di lipide preferibilmente lega una proteina serica, ad esempio, siero albumina umana (HSA). Un ligando di legame HSA consente la distribuzione del coniugato a un tessuto bersaglio, ad esempio, un tessuto bersaglio non renale dell'organismo. Ad esempio, il tessuto bersaglio può essere il fegato, incluse cellule parenchimali del fegato. Altre molecole che possono legare HSA possono anche essere usate come ligandi. Ad esempio, è possibile usare neproxina o aspirina. Un lipide o ligando a base di lipide può (a) aumentare la resistenza alla degradazione del coniugato, (b) aumentare il bersagliamento o il trasporto in una cellula o membrana bersaglio e/o (c) può essere usato per regolare il legame a una proteina serica, ad esempio, HSA.

M104.D1.SM.1DE

Un ligando a base di lipide può essere usato per modulare, ad esempio, controllare il legame del coniugato a un tessuto bersaglio. Ad esempio, un lipide o ligando a base di lipide che si lega a un HSA più fortemente sarà meno probabilmente indirizzato verso il rene e pertanto meno probabilmente eliminato dall'organismo. Un ligando lipidico o a base di lipide che si lega ad HSA meno fortemente può essere usato per indirizzare il coniugato verso il rene.

In una forma di realizzazione preferita, il ligando a base di lipide si lega ad HSA. Preferibilmente, esso si lega ad HSA con un'affinità sufficiente in modo tale che il coniugato sarà preferibilmente distribuito su un tessuto non renale. Tuttavia, si preferisce che l'affinità non sia così forte così che non si possa invertire il legame HSA-ligando.

In un'altra forma di realizzazione preferita, il ligando a base di lipide si lega ad HSA più debolmente o per nulla, cosicché il coniugato sarà preferibilmente distribuito nel rene. Altre frazioni caratteristiche che mirano alle cellule renali, possono anche essere usate al posto di o in aggiunta al ligando a base di lipide.

In un altro aspetto, il ligando è una frazione caratteristica, ad esempio, una vitamina, che è assorbita da una cellula bersaglio, ad esempio, una cellula proliferante. Queste sono particolarmente utili per trattare disturbi caratterizzati da proliferazione cellulare indesiderata, ad esempio, del tipo maligno o non maligno, ad esempio, cellule cancerose. Vitamine esemplificative includono vitamina A, E e K. Altre vitamine esemplificative includono la

M104.D1.SM.1DE

vitamina B, ad esempio, acido folico, B12, riboflavina, biotina, piridoxale o altre vitamine o nutrienti prelevati dalle cellule cancerose. Sono anche inclusi HAS, lipoproteina a bassa densità (LDL) e lipoproteina ad alta densità (HDL).

In un altro aspetto, il ligando è un agente di permeazione cellulare, preferibilmente un agente di permeazione di cellule elicoidale. Preferibilmente l'agente è anfipatico. Un agente esemplificativo è un peptide quale tat o antennopodia. Se l'agente è un peptide può essere modificato incluso un peptidomimetico, invertomeri, legami non peptidici o pseudopeptidici e l'uso di D-amminoacidi. L'agente elicoidale è preferibilmente un agente alfa-elica, che preferibilmente ha una fase lipofila e una fase lipofoba.

Il ligando può essere un peptide o peptidomimetico. Un peptidomimetico (indicato anche qui come oligopeptido-mimetico) è una molecola in grado di ripiegarsi in una struttura tridimensionale definita simile a un peptide naturale. Il peptide o la frazione caratteristica peptidomimetica può essere lunga circa 5-50 amminoacidi, ad esempio, lunga circa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 amminoacidi (si veda la Tabella 7, ad esempio).

Tabella 7. Peptidi di permeazione cellulare esemplificativi.

	Sequenza amminoacidica	Riferimento
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 269:10444, 1994
Frammento Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives <i>et al.</i> , J. Biol. Chem., 272:16010, 1997
Peptide a base di sequenza segnale	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKR KV	Chaloin <i>et al.</i> , Biochem. Biophys. Res. Commun., 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Elmqvist <i>et al.</i> , Exp. Cell Res., 269:237, 2001
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga <i>et al.</i> , FASEB J., 12:67, 1998
Peptide modello anfilico	KLALKLALKALKAALKLA	Oehlke <i>et al.</i> , Mol. Ther., 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRRR	Mitchell <i>et al.</i> , J. Pept. Res., 56:318, 2000
Permeazione della parete cellulare batterica	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE	
Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQG GPR	
a-defensina	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	
b-defensina	DHYNCSVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTC YRGKAKCK	
Bactenecina	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGF PPRFPPRFPGKR-NH ₂	
Indolicidina	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	

Un peptide o peptidomimetico può essere, ad esempio, un peptide di permeazione cellulare, un peptide cationico, un peptide anfipatico, un peptide idrofobo (ad esempio, costituito principalmente da Tyr, Trp o Phe). La frazione caratteristica peptidica può essere un peptide dendrimerico, un peptide vincolato o un peptide sottoposto a reticolazione. In un'altra alternativa, la frazione caratteristica

M104.D1.SM.1DE

peptidica può includere una sequenza di traslocazione di membrana idrofoba (MTS). Un peptide contenente MTS idrofobo esemplificativo è RFGF avente la sequenza di amminoacidi AAVALLPAVLLALLAP. Un analogo di RFGF (ad esempio, sequenza di amminoacidi AALLPVLLAAP) contenente un MTS idrofobo può anche essere una frazione caratteristica di bersagliamento. La frazione caratteristica peptidica può essere un peptide di "rilascio" che può portare grandi molecole polari inclusi peptidi, oligonucleotidi, e proteine attraverso le membrane cellulari. Ad esempio, le sequenze della proteina Tat di HIV (GRKKRRQRRRPPQ) e della proteina Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK) sono risultate in grado di funzionare come peptidi di rilascio. Un peptide o peptidomimetico può essere codificato da una sequenza casuale di DNA, quale un peptide identificato da una libreria di phage-display, o una libreria combinatoriale o una-sfera-un-composto (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Preferibilmente il peptide o peptidomimetico attaccato a un agente di iRNA attraverso una unità monomericamente incorporata è un peptide di bersagliamento cellulare quale un peptide arginina-glicina-acido aspartico (RGD), o un mimetico di RGD. Una frazione caratteristica peptidica può variare di lunghezza da circa 5 amminoacidi a circa 40 amminoacidi. Le frazioni caratteristiche peptidiche possono avere una modificazione strutturale tale da aumentare la stabilità o guidare le proprietà conformazionali. Una qualsiasi delle modificazioni strutturali descritte di seguito può essere utilizzata.

Una frazione caratteristica peptidica RGD può essere usata per

M104.D1.SM.1DE

mirare una cellula tumorale quale una cellula tumorale endoteliale o una cellula tumorale di cancro mammario (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Un peptide RGD può facilitare il bersagliamento di un agente di iRNA nei tumori di una varietà di altri tessuti inclusi polmone, rene, milza, o fegato (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Preferibilmente il peptide RGD faciliterà il bersagliamento di un agente di iRNA al rene. Il peptide RGD può essere lineare o ciclico e può essere modificato, ad esempio, glicosilato o metilato per facilitare il bersagliamento in tessuti specifici. Ad esempio, un peptide RGD glicosilato può rilasciare un agente di iRNA in una cellula tumorale che esprime $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

Peptidi che mirano marker arricchiti di cellule proliferative possono essere usati. Ad esempio, peptidi e peptidomimetici contenenti RGD possono mirare le cellule cancerose, in particolare le cellule che presentano una integrina $\alpha_v\beta_3$. Pertanto, è possibile usare peptidi RGD, peptidi ciclici contenenti RGD, peptidi RGD che includono D-amminoacidi, nonché mimetici di RGD sintetici. Oltre a RGD è possibile usare altre frazioni caratteristiche che mirano il ligando integrina $\alpha_v\beta_3$. In generale tali ligandi possono essere usati per controllare le cellule proliferative e l'angiogenesi. Coniugati preferiti di questo tipo sono ligandi specifici che mirano PECAM-1, VEGF, o altro gene canceroso, ad esempio, un gene canceroso descritti qui.

Un "peptide di permeazione cellulare" è in grado di permeare una

M104.D1.SM.1DE

cellula, ad esempio, una cellula microbica, quale una cellula batterica o fungina, o una cellula di mammifero quale una cellula umana. Un peptide di permeazione delle cellule microbiche può, ad esempio, essere un peptide lineare ad α -elica (ad esempio, LL-37 o Ceropin P1), un peptide contenente un legame disolfuro (ad esempio, α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un peptide contenente soltanto uno o due amminoacidi dominanti (ad esempio, PR-39 o indolicidina). Un peptide di permeazione cellulare può anche includere un segnale di localizzazione nucleare (NLS). Ad esempio, un peptide di permeazione cellulare può essere un peptide anfipatico bipartito, quale MPG, che è derivato dal dominio del peptide di fusione di HIV-1 gp41 e NLS dell'antigene T grande di SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

In una forma di realizzazione, un peptide di bersagliamento attaccato a un agente di iRNA e/o l'oligomero veicolo possono essere un peptide α -elica anfipatico. Peptidi α -elica anfipatici esemplificativi includono, senza limitazione, cecropine, licotossine, paradaxine, buforina, CPF, peptide bombinina-simile (BLP), catelicidine, ceratotossine, peptidi S. clava, peptidi antimicrobici intestinali di missinoide (HFIAP), magainine, brevinine-2, dermaseptine, melittine, pleurocidina, peptidi H₂A, peptidi Xenopus, esculentine-1, e caerine. Un numero di fattori sarà preferibilmente considerato mantenere l'integrità della stabilità dell'elica. Ad esempio, un numero massimo di residui di stabilizzazione dell'elica sarà utilizzato (ad esempio, leu, ala, o lys), e un numero minimo di

M104.D1.SM.1DE

residui di destabilizzazione dell'elica sarà utilizzato (ad esempio, prolina, o unità monomeriche cicliche). Il residuo di protezione sarà considerato (ad esempio, Gly è un residuo di N-protezione esemplificativo e/o ammidazione C-terminale può essere usata per fornire un extra legame H per stabilizzare l'elica. La formazione di ponti di sale tra residui con cariche opposte separati da $i+3$, o $i+4$ posizioni può fornire stabilità. Ad esempio, residui cationici quali lisina, arginina, omo-arginina, ornitina o istidina possono formare ponti di sale con i residui anionici glutammato o aspartato.

Ligandi peptidici e peptidomimetici includono quelli aventi peptidi naturali o modificati, ad esempio, peptidi D o L; peptidi α , β , o γ ; N-metil peptidi; azapeptidi; peptidi aventi una o più ammidi, ossia, peptidi, legami sostituiti con uno o più legami urea, tiourea, carbammato, o solfonil urea; o peptidi ciclici.

Il ligando di bersagliamento può essere qualsiasi ligando in grado di mirare un recettore specifico. Esempi sono: folato, GalNAc, galattosio, mannosio, mannosio-6P, cluster di zuccheri quali cluster di GalNAc, cluster di mannosio, cluster di galattosio, o un aptamero. Un cluster è una combinazione di due o più unità di zucchero. Il ligando di bersagliamento include anche ligandi del recettore dell'integrina, ligandi del recettore delle chemochine, ligandi del recettore di transferrina, biotina, serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandi LDL e HDL. I ligandi possono anche essere a base di acido nucleico, ad esempio, un aptamero. L'aptamero può essere non modificato o avere qualsiasi combinazione di

M104.D1.SM.1DE

modificazioni descritte qui.

Agenti di rilascio endosomiali includono imidazoli, poli o oligoimidazoli, PEI, peptidi, peptidi fusogenici, policarbossilati, policationi, oligo o poli cationi o anioni mascherati, acetali, poliacetali, chetali/polichetali, ortoesteri, polimeri con cariche cationiche o anioniche mascherate o non mascherate, dendrimeri con cariche cationiche o anioniche mascherate o non mascherate.

Il modulatore PK indica un modulatore farmacocinetico. Il modulatore PK include lipofili, acidi biliari, steroidi, analoghi fosfolipidici, peptidi, agenti di legame proteico, PEG, vitamine, ecc. Modulatori PK esemplificativi includono, senza limitazione, colesterolo, acidi grassi, acido colico, acido litocolico, dialchilgliceridi, diacilgliceride, fosfolipidi, sfingolipidi, naproxen, ibuprofene, vitamina E, biotina, ecc. Oligonucleotidi che comprendono un numero di legami fosforotioato sono anche noti legare le proteine seriche, pertanto oligonucleotidi corti, ad esempio, oligonucleotidi di circa 5 basi, 10 basi, 15 basi o 20 basi, compresi molteplici legami fosforotioato nello scheletro sono anche considerabili per la presente invenzione come ligandi (ad esempio ligandi di modulazione di PK).

Inoltre, gli aptameri che legano composti serici (ad esempio proteine seriche) sono anche considerabili come ligandi di modulazione di PK.

Altri ligandi considerabili nella presente sono descritti nelle domande copendenti USSN: 10/916.185, depositata il 10 agosto 2004;

M104.D1.SM.1DE

USSN: 10/946.873, depositata il 21 settembre 2004; USSN: 10/833.934, depositata il 3 agosto 2007; USSN: 11/115.989 depositata il 27 aprile 2005 e USSN: 11/944.227 depositata il 21 novembre 2007.

Quando due o più ligandi sono presenti, i ligandi possono avere tutti le stesse proprietà, tutti avere proprietà diverse o alcuni ligandi possono avere le stesse proprietà mentre altri hanno proprietà diverse. Ad esempio, un ligando può avere proprietà di bersagliamento, avere attività endosomolitica o avere proprietà di modulazione di PK. In una forma di realizzazione preferita, tutti i ligandi hanno proprietà diverse.

I ligandi possono essere accoppiati agli oligonucleotidi in varie posizioni, ad esempio sull'estremità 3', l'estremità 5' o in una posizione interna. In forme di realizzazione preferite, il ligando è attaccato agli oligonucleotidi tramite un attacco intermedio. Il ligando o il ligando attaccato può essere presente su un monomero quando detto monomero è incorporato nel filamento in crescita. In alcune forme di realizzazione, il ligando può essere incorporato attraverso appaiamento a un monomero "precursore" dopo che detto monomero "precursore" è stato incorporato nel filamento in crescita. Ad esempio, un monomero avente, ad esempio, un attacco ammino-terminato (ossia, non avente ligando associato), ad esempio, TAP-(CH₂)_nNH₂ può essere incorporato in un filamento senso o antisenso in crescita. In una operazione successiva, ossia, dopo l'incorporazione del monomero precursore nel filamento, un ligando avente un gruppo elettrofilo, ad esempio, un pentafluorofenil estere

M104.D1.SM.1DE

o un gruppo aldeide, può successivamente essere attaccato al monomero precursore mediante accoppiamento del gruppo elettrofilo del ligando con il gruppo nucleofilo terminale dell'attacco, del monomero precursore.

Per oligonucleotidi a doppio filamento, i ligandi possono essere attaccati a uno o entrambi i filamenti. In alcune forme di realizzazione, un agente di iRNA a doppio filamento contiene un ligando coniugato al filamento senso. In altre forme di realizzazione, un agente di iRNA a doppio filamento contiene un ligando coniugato al filamento antisenso.

In alcune forme di realizzazione, il ligando può essere coniugato a nucleobasi, frazioni caratteristiche di zucchero o legami internucleosidici di molecole di acido nucleico. La coniugazione a nucleobasi puriniche o loro derivati può avvenire in qualsiasi posizione inclusi atomi endociclici ed esociclici. In alcune forme di realizzazione, le posizioni 2, 6, 7, o 8 di una nucleobase purinica sono attaccate a una frazione caratteristica coniugata. La coniugazione a nucleobasi pirimidiniche o loro derivati può anche verificarsi in qualsiasi posizione. In alcune forme di realizzazione, le posizioni 2, 5 e 6 di una nucleobase pirimidinica possono essere sostituite con una frazione caratteristica coniugata. La coniugazione a frazioni caratteristiche di zucchero di nucleosidi può avvenire su qualsiasi atomo di carbonio. Atomi di carbonio esemplificativi di una frazione caratteristica di zucchero che può essere anche attaccata a una frazione caratteristica coniugata, includono atomi di carbonio in

M104.D1.SM.1DE

2', 3', e 5'. La posizione 1' può essere attaccata a una frazione caratteristica coniugata come in un residuo abasico. Legami internucleosidici possono anche portare frazioni caratteristiche coniugate. Per legami contenenti fosforo (ad esempio, fosfodiesteri, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoamidato e simili), la frazione caratteristica coniugata può essere attaccata direttamente all'atomo di fosforo o a un atomo di O, N, o S legato all'atomo di fosforo. Per legami internucleosidici contenenti ammina o ammidi (ad esempio, PNA), la frazione caratteristica coniugata può essere attaccata all'atomo di azoto dell'ammina o dell'ammido o a un atomo di carbonio adiacente.

Vi sono numerosi metodi per preparare coniugati di composti oligomerici. In generale, un composto oligomerico è attaccato a una frazione caratteristica coniugata mettendo a contatto un gruppo reattivo (ad esempio, OH, SH, ammina, carbossile, aldeide e simili) sul composto oligomerico con un gruppo reattivo sulla frazione caratteristica coniugata. In alcune forme di realizzazione, un gruppo reattivo è elettrofilo e l'altro è nucleofilo.

Ad esempio, un gruppo elettrofilo può essere una funzionalità contenente carbonile e un gruppo nucleofilo può essere un'ammina o un tiolo. Metodi per la coniugazione di acidi nucleici e composti oligomerici affini con e senza gruppi di legame sono anche descritti nella letteratura come ad esempio, in Manoharan in *Antisense Research and Applications*, Crooke and LeBleu, ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Capitolo 17.

M104.D1.SM.1DE

Brevetti statunitensi rappresentativi che descrivono la preparazione di coniugati oligonucleotidi includono, senza limitazioni, i brevetti U.S. n. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.149.782; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.672.662; 5.688.941; 5.714.166; 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; 6.559.279.

Definizioni

Per comodità, il significato di alcuni termini e di alcune frasi usati nella descrizione, negli esempi e nelle rivendicazioni allegare, è fornito di seguito. Se vi è una discrepanza apparente tra l'uso di un termine in altre parti della presente descrizione e la sua definizione fornita in questa sezione, prevarrà la definizione in questa sezione.

"G", "C", "A" e "U" indicano ognuno un nucleotide che contiene guanina, citosina, adenina e uracile come base, rispettivamente. Tuttavia, si comprenderà che il termine "ribonucleotide" o

M104.D1.SM.1DE

"nucleotide" può anche indicare un nucleotide modificato come descritto in dettaglio ulteriormente di seguito, o una frazione caratteristica di sostituzione surrogata. L'esperto è consapevole del fatto che la guanina, la citosina, l'adenina e l'uracile possono essere sostituiti da altre frazioni caratteristiche senza alterare sostanzialmente le proprietà di appaiamento delle basi di un oligonucleotide incluso un nucleotide che porta tale frazione caratteristica di sostituzione. Ad esempio, senza limitazione, un nucleotide comprendente inosina come sua base può avere un appaiamento di base con nucleotidi contenenti adenina, citosina o uracile. Pertanto, nucleotidi contenenti uracile, guanina, o adenina possono essere sostituiti nelle sequenze nucleotidiche descritte qui da un nucleotide contenente, ad esempio, inosina. Sequenze comprendenti tali frazioni caratteristiche di sostituzione sono forme di realizzazione descritte qui.

Con "Fattore VII" come usata qui, si intende un Fattore VII mRNA, proteina, peptide, o polipeptide. Il termine "Fattore VII" è anche noto nella tecnica come AI132620, Cf7, precursore del fattore VII di coagulazione, fattore VII di coagulazione, FVII, acceleratore della conversione della protrombina serica, proteina di coagulazione di FVII ed eptacog alfa.

Come usata qui, "sequenza bersaglio" si riferisce a una porzione contigua della sequenza nucleotidica di una molecola di mRNA formata durante la trascrizione del gene, inclusa mRNA che è un prodotto del processamento di RNA di un prodotto di trascrizione primario.

M104.D1.SM.1DE

Come usata qui, l'espressione "filamento comprendente una sequenza" si riferisce a un oligonucleotide comprendente una catena di nucleotidi che è descritta dalla sequenza indicata usando la nomenclatura nucleotidica standard.

Come usato qui, e salvo diversamente indicato, il termine "complementare", quando usato nel contesto di una coppia nucleotidica indica una coppia di Watson-Crick classica, ossia, GC, AT, o AU. Si estende anche agli appaiamenti di Watson-Crick classici in cui uno o entrambi i nucleotidi sono stati modificati come descritto qui, ad esempio, mediante una modificazione a ribosio o una modificazione dello scheletro fosfato. Può anche includere l'appaiamento con una inosina o altra entità che non altera sostanzialmente le proprietà di appaiamento delle basi.

Come usato qui, e salvo diversamente indicato, il termine "complementare", quando usato per descrivere una prima sequenza nucleotidica in relazione a una seconda sequenza nucleotidica, si riferisce alla capacità di un oligonucleotide o polinucleotide inclusa la prima sequenza nucleotidica ad ibridare e formare una struttura duplex in alcune condizioni con un oligonucleotide o polinucleotide comprendente la seconda sequenza nucleotidica come sarà compresa dall'esperto. Complementarietà può includere complementarietà completa, complementarietà sostanziale e complementarietà sufficiente per consentire l'ibridazione in condizioni fisiologiche, ad esempio, in condizioni fisiologicamente rilevanti e può essere incontrata all'interno di un organismo. La

M104.D1.SM.1DE

complementarietà completa si riferisce a complementarietà come sopra definito per una singola coppia, con tutte le coppie della prima e della seconda sequenza. Quando una sequenza è "sostanzialmente complementare" con una seconda sequenza qui, le due sequenze possono essere completamente complementari oppure possono formare una o più, ma generalmente non più di 4, 3 o 2 coppie di basi ad appaiamento errato in seguito a ibridazione, mantenendo al contempo la capacità di ibridare nelle condizioni più rilevanti per la loro applicazione finale. La complementarietà sostanziale può anche essere definita come ibridazione in condizioni stringenti, in cui le condizioni stringenti possono includere: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C per 12-16 ore con successivo lavaggio. L'esperto sarà in grado di determinare la serie di condizioni più adeguate per un test di complementarietà di due sequenze secondo l'applicazione finale dei nucleotidi ibridati.

Tuttavia, quando due oligonucleotidi sono progettati per formare, in seguito a ibridazione una o più sporgenze a singolo filamento, tali sporgenze non saranno considerate come disappaiamenti per quanto riguarda la determinazione della complementarietà. Ad esempio, un dsRNA comprendente un oligonucleotide con una lunghezza di 21 nucleotidi e un altro oligonucleotide con una lunghezza di 23 nucleotidi, in cui l'oligonucleotide più lungo include una sequenza di 21 nucleotidi che è completamente complementare all'oligonucleotide più corto, può essere tuttavia indicato come "completamente complementare".

M104.D1.SM.1DE

Sequenze "complementari" come usate qui, possono anche includere o essere formate interamente da coppie di basi non di Watson-Crick e/o coppie di basi formate da nucleotidi non naturali e modificati fintanto che i suddetti requisiti rispetto alla loro capacità di ibridare sono soddisfatti.

I termini "complementare", "completamente complementare", "sostanzialmente complementare" e sufficiente complementarità da consentire l'ibridazione in condizioni fisiologiche, ad esempio, in condizioni fisiologicamente rilevanti, come si possono incontrare all'interno di un organismo, possono essere usati qui relativamente all'appaiamento di basi tra il filamento senso e il filamento antisense di un dsRNA, o tra il filamento antisense di un dsRNA e una sequenza bersaglio come sarà compreso dal contesto del loro uso.

Come usato qui, un polinucleotide che è "complementare, ad esempio, sostanzialmente complementare ad almeno parte di" un RNA messaggero (mRNA) si riferisce a un polinucleotide che è complementare, ad esempio, sostanzialmente complementare a una porzione contigua di mRNA di interesse (ad esempio, codificante il fattore VII). Ad esempio, un polinucleotide complementare ad almeno una parte di mRNA del fattore VII se la sequenza è sostanzialmente complementare a una porzione non interrotta di un mRNA codificante il fattore VII.

L'espressione "RNA a doppio filamento" o "dsRNA" come usata qui, si riferisce a una molecola di acido ribonucleico o complesso di molecole di acido ribonucleico avente una struttura duplex

M104.D1.SM.1DE

comprendente due filamenti di acido nucleico antiparalleli e sostanzialmente complementari, come sopra definito. I due filamenti formanti la struttura duplex possono essere porzioni diverse di una molecola di RNA più grande oppure possono essere molecole di RNA separate. Quando i due filamenti sono parte di una molecola più grande e pertanto sono connessi da una catena ininterrotta di nucleotidi tra l'estremità 3' di un filamento e l'estremità 5' dell'altro rispettivo filamento formante la struttura duplex, la catena di RNA di connessione è indicata come "ansa a forcina". Quando i due filamenti sono connessi in modo covalente mediante altro rispetto a una catena ininterrotta di nucleotidi tra l'estremità 3' di un filamento e l'estremità 5' dell'altro rispettivo filamento formante la struttura duplex, la struttura di connessione è indicata come "linker". I filamenti di RNA possono avere lo stesso o un diverso numero di nucleotidi. Il numero massimo di coppie di basi è il numero di nucleotidi nel filamento più corto di dsRNA. Oltre alla struttura duplex, un dsRNA può comprendere una o più sporgenze nucleotidiche. Un dsRNA come usato qui è anche denominato "RNA inibitore piccolo", "siRNA", "agente siRNA", agente "iRNA" o "agente RNAi".

Come usata qui, una "sporgenza nucleotidica" si riferisce al nucleotide o ai nucleotidi non appaiati che sporgono dalla struttura duplex di un dsRNA quando un'estremità 3' di un filamento del dsRNA si estende oltre l'estremità 5' dell'altro filamento o viceversa. "Smussato" o "estremità smussata" indica che non vi sono nucleotidi

M104.D1.SM.1DE

non appaiati su tale estremità del dsRNA, ossia nessuna sporgenza nucleotidica. Un dsRNA a "estremità smussata" è un dsRNA che è a doppio filamento sulla sua intera lunghezza, ossia nessuna sporgenza nucleotidica su entrambe le estremità della molecola.

L'espressione "filamento antisenso" si riferisce al filamento di un dsRNA che include una regione che è sostanzialmente complementare a una sequenza bersaglio. Come usato qui, l'espressione "regione di complementarità" si riferisce alla regione sul filamento antisenso che è sostanzialmente complementare a una sequenza, ad esempio, una sequenza bersaglio, come definito qui. Quando la regione di complementarità non è completamente complementare alla sequenza bersaglio, i disappaiamenti sono principalmente tollerati sulle regioni terminali e, se presenti, sono generalmente in una regione o in regioni terminali, ad esempio, entro 6, 5, 4, 3, o 2 nucleotidi del 5' e/o 3' terminale.

L'espressione "filamento senso" come usata qui, si riferisce al filamento di un dsRNA che include una regione che è sostanzialmente complementare a una regione del filamento antisenso.

Il termine "identità" è il rapporto tra due o più sequenze polinucleotidiche, come determinato confrontando le sequenze. Identità indica anche il grado di correlazione di sequenze tra sequenze polinucleotidiche come determinato dalla corrispondenza tra stringhe di tali sequenze. Sebbene esista una serie di metodi per misurare l'identità tra due sequenze polinucleotidiche, il termine è ben noto ad esperti (si vedano, ad esempio, Sequence Analysis in

M104.D1.SM.1DE

Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); e Sequence Analysis Primer, Gribskov., M. e Devereux, J., ed., M. Stockton Press, New York (1991)). "Sostanzialmente identico" come usato qui, indica che vi è un elevato grado di omologia (preferibilmente il 100% di identità di sequenza) tra il filamento senso del dsRNA e la parte corrispondente del gene bersaglio. Tuttavia, dsRNA avente più del 90% o 95% di identità di sequenza può essere usato qui e, pertanto, variazioni di sequenze che ci si può attendere siano dovute a mutazione genetica, polimorfismo del ceppo o divergenze di evoluzione possono essere tollerate. Sebbene il 100% di identità sia preferito, dsRNA può contenere disappaiamenti casuali a singola coppia di base o multi coppie di basi tra RNA e gene bersaglio.

"Introduzione in una cellula" quando riferito a un dsRNA, indica la facilitazione della captazione o assorbimento nella cellula come è compreso dagli esperti nella tecnica. Assorbimento o captazione di dsRNA può avvenire tramite processi cellulari diffusivi o attivi non coadiuvati o mediante agenti o dispositivi ausiliari. Il significato di questo termine non è limitato alle cellule in vitro; un dsRNA può anche essere "introdotto in una cellula", in cui la cellula è parte di un organismo vivente. In tali casi, l'introduzione nella cellula includerà il rilascio nell'organismo. Ad esempio, per il rilascio in vivo, dsRNA può essere iniettato in un sito tissutale o somministrato in modo sistemico. L'introduzione in vitro in una cellula include metodi noti nella tecnica quali elettroporazione e lipofezione.

I termini "silenzio" e "inibire l'espressione di", per quanto si

M104.D1.SM.1DE

riferiscono al gene del fattore VII, qui si riferiscono ad almeno la soppressione parziale dell'espressione del gene del fattore VII come manifestato da una riduzione della quantità di mRNA dal gene del fattore VII che può essere isolato da una prima cellula o gruppo di cellule in cui il gene del fattore VII è trascritto e che è stato o che sono stati trattati in modo tale che l'espressione del gene del fattore VII sia inibita rispetto a una seconda cellula o secondo gruppo di cellule sostanzialmente identico alla prima cellula o primo gruppo di cellule ma che non è stato o non sono stati trattati (cellule di controllo). Il grado di inibizione è solitamente espresso in termini di

$$\frac{(\text{mRNA in cellule di controllo}) - (\text{mRNA in cellule trattate})}{(\text{mRNA in cellule di controllo})} \bullet 100 \%$$

In alternativa, il grado di inibizione può essere indicato in termini di una riduzione di un parametro che è funzionalmente associato alla trascrizione del gene del fattore VII, ad esempio, la quantità di proteina codificata dal gene del fattore VII che è secreta da una cellula, o il numero di cellule che presentano un determinato fenotipo, ad esempio apoptosi. In linea di principio, il silenziamento del gene del fattore VII può essere determinato in qualsiasi cellula che esprime il bersaglio, o in modo costitutivo o mediante ingegnerizzazione genomica e mediante qualsiasi saggio adeguato. Tuttavia, quando è necessario un riferimento al fine di determinare se un dato siRNA inibisce l'espressione del gene del fattore VII di un determinato grado, i saggi forniti negli esempi che

M104.D1.SM.1DE

seguono serviranno come tale riferimento.

Ad esempio, in alcuni casi, l'espressione del gene del fattore VII è soppressa per almeno circa 20%, 25%, 35%, 40% o 50% mediante la somministrazione dell'oligonucleotide a doppio filamento descritto qui. In una forma di realizzazione, il gene del fattore VII è soppresso di almeno circa 60%, 70% o 80% mediante somministrazione dell'oligonucleotide a doppio filamento descritto qui. In una forma di realizzazione maggiormente preferita, il gene del fattore VII è soppresso di almeno circa 85%, 90% o 95% dalla somministrazione dell'oligonucleotide a doppio filamento descritto qui.

I termini "trattare", "trattamento" e simili, si riferiscono all'attenuazione o all'alleviamento di una malattia o disturbo. Finora, per quanto riguarda uno qualsiasi delle altre condizioni indicate qui di seguito, (ad esempio, una condizione mediata dal fattore VII diverso a un disturbo trombotico), i termini "trattare", "trattamento" e simili indicano l'attenuazione o l'alleviamento di almeno un sintomo associato a tale condizione o il rallentamento o il blocco della progressione di tale condizione.

Una composizione "terapeuticamente rilevante" può alleviare una malattia o un disturbo o un sintomo di una malattia o un disturbo quando somministrata in una dose adeguata.

Come usata qui, l'espressione "condizione o malattia mediata dal fattore VII" e termini e frasi affini, si riferiscono a una condizione o un disturbo caratterizzato da un'attività inadeguata, ad esempio, superiore al normale del fattore VII. Un'attività funzionale

M104.D1.SM.1DE

del fattore VII inadeguata può aver luogo come conseguenza dell'espressione del fattore VII in cellule che normalmente non esprimono il fattore VII o un'espressione del fattore VII aumentata (che determina, ad esempio, un sintomo di una febbre emorragica virale o un trombo). Una condizione o malattia mediata dal fattore VII può completamente o parzialmente essere mediata dall'attività funzionale del fattore VII inadeguata. Tuttavia, una condizione o una malattia mediata dal fattore VII è una in cui la modulazione del fattore VII determina un certo effetto sulla condizione o il disturbo alla base, (ad esempio, un inibitore del fattore VII determina un certo miglioramento del benessere del paziente in almeno alcuni pazienti).

Una "febbre emorragica" include una combinazione di malattie causate da un'infezione virale. La febbre e i sintomi gastrointestinali sono tipicamente seguiti da emorragia capillare.

Una "coagulopatia" è qualsiasi difetto nel meccanismo di coagulazione del sangue di un soggetto.

Come usate qui, un "disturbo trombotico" è qualsiasi disturbo, preferibilmente risultante dall'espressione di FVII indesiderata, incluso qualsiasi disturbo caratterizzato da una coagulazione del sangue indesiderata.

Come usata qui, le frasi "quantità terapeuticamente efficace" e "quantità profilatticamente efficace" si riferiscono a una quantità che fornisce un beneficio terapeutico nel trattamento e nella prevenzione o controllo di una febbre emorragica virale o un sintomo

M104.D1.SM.1DE

evidente di tale disturbo, ad esempio emorragia, febbre, debolezza, dolore muscolare, mal di testa, infiammazione o shock circolatorio. La quantità specifica che è terapeuticamente efficace può essere facilmente determinata da un medico ordinario e può variare a seconda di fattori noti nella tecnica, quali, ad esempio, il tipo di disturbo trombotico, l'anamnesi e l'età del paziente, lo stadio della malattia e la somministrazione di altri agenti.

Come usata qui, una "composizione farmaceutica" include una quantità farmacologicamente efficace di un dsRNA e un veicolo farmaceuticamente accettabile. Come usata qui, "quantità farmacologicamente efficace", "quantità terapeuticamente efficace" o semplicemente "quantità efficace" si riferisce alla quantità di un RNA efficace a produrre il risultato farmacologico, terapeutico o preventivo desiderato. Ad esempio, se un dato trattamento clinico è considerato efficace quando vi è almeno una riduzione del 25% in un parametro misurabile associato a una malattia o un disturbo, una quantità terapeuticamente efficace di un farmaco per il trattamento di tale malattia o disturbo è la quantità necessaria ad effettuare almeno una riduzione del 25% di tale parametro.

L'espressione "veicolo farmaceuticamente accettabile" si riferisce a un veicolo per la somministrazione di un agente terapeutico. Tali veicoli includono, senza limitazione, soluzione salina, soluzione salina tamponata, destrosio, acqua, glicerolo, etanolo, e loro combinazioni. L'espressione esclude specificamente il terreno di coltura cellulare. Per farmaci somministrati oralmente,

M104.D1.SM.1DE

veicoli farmaceuticamente accettabili includono, ma senza limitazione, eccipienti farmaceuticamente accettabili quali diluenti inerti, agenti disintegranti, agenti di legame, agenti lubrificanti, dolcificanti, aromatizzanti, coloranti e conservanti. Diluenti inerti adeguati includono carbonato di sodio e di calcio, fosfato di sodio e di calcio, e lattosio, mentre amido di mais e acido alginico sono adeguati agenti disintegranti. Agenti di legame possono includere amido e gelatina, mentre l'agente lubrificante, se presente, sarà generalmente stearato di magnesio, acido stearico o talco. Se si desidera, le compresse possono essere rivestite con un materiale quale gliceril monostearato o gliceril distearato, per ritardare l'assorbimento nel tratto gastrointestinale.

Come usata qui, una "cellula trasformata" è una cellula in cui un vettore è stato introdotto da cui può essere espressa una molecola di dsRNA.

Caratteristiche di particelle acido nucleico-lipide

In alcune forme di realizzazione sono descritti qui metodi e composizioni per produrre particelle lipidiche di acido nucleico incapsulato in cui gli acidi nucleici sono incapsulati all'interno di uno strato lipidico. Tali particelle di acido nucleico-lipide che incorporano oligonucleotidi di siRNA sono caratterizzate da una varietà di parametri biofisici inclusi: (1) rapporto farmaco/lipide; (2) efficienza di incapsulamento; e (3) granulometria. Rapporti elevati di farmaco/lipide, efficienza di incapsulamento elevata, buona resistenza a nucleasi e buona stabilità serica e controllabile

M104.D1.SM.1DE

granulometria, generalmente inferiore a 200 nm di diametro sono desiderabili. Inoltre, la natura del polimero di acido nucleico è significativa, in quanto la modificazione di acidi nucleici nel tentativo di conferire resistenza alle nucleasi aumenta il costo delle sostanze terapeutiche, mentre in molti casi fornisce soltanto resistenza limitata. Salvo diversamente indicato, questi criteri sono calcolati qui descrizione come segue:

il rapporto acido nucleico/lipide è la quantità di acido nucleico in un volume definito di preparazione divisa per la quantità di lipide nello stesso volume. Ciò può essere su una base molare o su una base ponderale o su una base di peso in mole. Per formulazioni finali, pronte per la somministrazione, il rapporto acido nucleico:lipide è calcolato dopo che la dialisi, la cromatografia e/o la digestione enzimatica (ad esempio, nucleasi) è stata impiegata per rimuovere il più possibile l'acido nucleico esterno;

l'efficienza di incapsulamento si riferisce al rapporto farmaco/lipide della miscela di partenza diviso per il rapporto farmaco/lipide della formulazione finale competente di somministrazione. Questa è una misura di efficienza relativa. Per una misura di efficienza assoluta, la quantità totale di acido nucleico addizionata alla miscela di partenza che termina nella formulazione competente di somministrazione può anche essere calcolata. La quantità di lipide persa durante il processo di formulazione può anche essere calcolata.

M104.D1.SM.1DE

L'efficienza è una misura dello spreco e del costo della formulazione; e

la dimensione indica la dimensione (diametro) delle particelle formate. La distribuzione granulometrica può essere determinata usando una diffusione di luce quasi elastica (QELS) su un dimensionatore sub-micronico Nicomp Model 370. Le particelle al di sotto di 200 nm sono preferite per la distribuzione in tessuti neovascolarizzati (con perdite), quali neoplasmi e siti di infiammazione.

Metodi di preparazione di particelle lipidiche

I metodi e le composizioni descritti qui utilizzano alcuni lipidi cationici, la cui sintesi, preparazione e caratterizzazione sono descritte di seguito e negli esempi allegati. Inoltre, sono descritti qui metodi di preparazione di particelle lipidiche comprendenti quelle associate a un agente terapeutico, ad esempio, un acido nucleico. Nei metodi descritti qui, una miscela di lipidi è combinata con una soluzione acquosa tamponata di acido nucleico per produrre una miscela intermedia contenente acido nucleico incapsulato in particelle lipidiche in cui gli acidi nucleici incapsulati sono presenti in un rapporto acido nucleico/lipide da circa 3% in peso a circa 25% in peso, preferibilmente da 5 a 15% in peso. La miscela intermedia può opzionalmente essere dimensionata così da ottenere particelle lipidiche di acido nucleico incapsulato in cui le porzioni lipidiche sono vescicole unilamellari, preferibilmente aventi un diametro da 30 a 150 nm, più preferibilmente da circa 40 a 90 nm. Il

M104.D1.SM.1DE

pH è quindi aumentato per neutralizzare almeno una porzione delle cariche superficiali sulle particelle lipidiche di acido nucleico fornendo così una composizione lipide-acido nucleico incapsulato almeno parzialmente neutralizzata in superficie.

Come sopra descritto, parecchi di questi lipidi cationici sono ammino lipidi che sono caricati a un pH inferiore a pK_a del gruppo amminico e sostanzialmente neutri a un pH al di sopra di pK_a . Questi lipidi cationici sono denominati lipidi cationici titolabili e possono essere usati nelle formulazioni descritte qui usando un processo in due fasi. In primo luogo, vescicole lipidiche possono essere formate a pH inferiore con lipidi cationici titolabili e altri componenti della vescicola in presenza di acidi nucleici. In questo modo, le vescicole incapsuleranno e intrappoleranno gli acidi nucleici. In secondo luogo, la carica superficiale delle nuove vescicole formate può essere neutralizzata aumentando il pH del terreno a un livello al di sopra di pK_a dei lipidi cationici titolabili presenti, ossia, a pH fisiologico o superiore. Aspetti particolarmente vantaggiosi di questo procedimento includono sia la facile rimozione di qualsiasi acido nucleico assorbito in superficie sia un veicolo di rilascio di acido nucleico risultante che ha una superficie neutra. I liposomi o particelle lipidiche aventi una superficie neutra ci si attende che evitino la rapida clearance dalla circolazione e che evitino alcune tossicità che sono associate alle preparazioni liposomiali cationiche. Ulteriori dettagli relativi a questi usi di tali lipidi cationici titolabili nella formulazione di

M104.D1.SM.1DE

particelle acido nucleico-lipide sono forniti nel brevetto US 6.287.591 e nel brevetto US 6.858.225.

È inoltre evidenziato che le vescicole formate in questo modo forniscono formulazioni di dimensione di vescicola uniforme con elevato contenuto di acidi nucleici. In aggiunta, le vescicole hanno un intervallo di dimensione da circa 30 a circa 150 nm, più preferibilmente da circa 30 a circa 90 nm.

Senza voler essere vincolati a una particolare teoria, si ritiene che l'efficienza molto elevata dell'incapsulamento di acido nucleico sia il risultato di un'interazione elettrostatica a pH basso. A pH acido (ad esempio pH 4,0) la superficie della vescicola è caricata e si lega a una porzione di acidi nucleici tramite interazioni elettrostatiche. Quando il tampone acido esterno è sostituito con un tampone più neutro (ad esempio, pH 7,5) la superficie della particella lipidica o liposoma è neutralizzata consentendo a qualsiasi acido nucleico esterno di essere rimosso. Informazioni più dettagliate sul processo di formulazione sono fornite in varie pubblicazioni (ad esempio, il brevetto US 6.287.591 e il brevetto US 6.858.225).

In considerazione di quanto precede, sono descritti qui metodi di preparazione di formulazioni lipide/acido nucleico. Nei metodi descritti qui, una miscela di lipidi è combinata con una soluzione acquosa tamponata di acido nucleico per produrre una miscela intermedia contenente acido nucleico incapsulato in particelle lipidiche, ad esempio, in cui gli acidi nucleici incapsulati sono

M104.D1.SM.1DE

presenti in un rapporto acido nucleico/lipide da circa 10% in peso a circa 20% in peso. La miscela intermedia può opzionalmente essere dimensionata per ottenere particelle di lipide/acido nucleico incapsulato in cui le porzioni lipidiche sono vescicole unilamellari, preferibilmente aventi un diametro da 30 a 150 nm, più preferibilmente da circa 40 a 90 nm. Il pH è quindi aumentato per neutralizzare almeno una porzione delle cariche di superficie sulle particelle acido nucleico-lipide fornendo così una composizione lipide-acido nucleico incapsulato almeno parzialmente neutralizzata in superficie.

In alcune forme di realizzazione, la miscela di lipidi include almeno due componenti lipidici: un primo componente ammino lipidico descritto qui che è selezionato tra lipidi che hanno una pKa tale che il lipide è cationico a un pH inferiore a pKa e neutro a pH al di sopra di pKa, e un secondo componente lipidico che è selezionato tra lipidi che prevengono l'aggregazione particellare durante la formazione di particelle acido nucleico-lipide. In particolari forme di realizzazione, l'ammino lipide è un nuovo lipide cationico descritto qui.

Nella preparazione di particelle di acido nucleico-lipide descritte qui, la miscela di lipidi è tipicamente una soluzione di lipidi in un solvente organico. Questa miscela di lipidi può essere quindi essiccata così da formare un film sottile o liofilizzata per formare una polvere prima di essere idratata con un tampone acquoso per formare liposomi. In alternativa, in un metodo preferito, la

M104.D1.SM.1DE

miscela lipidica può essere solubilizzata in un alcol miscibile in acqua quale etanolo e questa soluzione etanolica addizionata a un tampone acquoso, determinando formazione di liposoma spontanea. Nella maggior parte delle forme di realizzazione, l'alcol è usato nella forma disponibile in commercio. Ad esempio, è possibile usare etanolo come etanolo assoluto (100%) o come etanolo al 95%, la parte restante essendo acqua. Questo metodo è descritto in maggior dettaglio nel brevetto US 5.976.567).

In una forma di realizzazione esemplificativa, la miscela di lipidi è una miscela di lipidi cationici, lipidi neutri (diversi da un lipide cationico), uno sterolo (ad esempio colesterolo) e un lipide PEG-modificato (ad esempio, PEG-DMG o PEG-cDMA) in un solvente alcol. In forme di realizzazione preferite, la miscela lipidica consiste sostanzialmente in un lipide cationico, un lipide neutro, colesterolo e un lipide PEG-modificato in alcol, più preferibilmente etanolo. In ulteriori forme di realizzazione preferite, la prima soluzione consiste nella suddetta miscela lipidica in rapporti molari di circa 20-70% di lipide cationico:5-45% di lipide neutro:20-55% di colesterolo:0,5-15% di lipide PEG-modificato. In ulteriori forme di realizzazione preferite, la prima soluzione consiste sostanzialmente in un lipide selezionato dalla Tabella 1, DSPC, Chol e PEG-DMG o PEG-cDMA, più preferibilmente in un rapporto molare di circa 20-60% di lipide cationico:5-25% DSPC:25-55% Chol:0,5-15% PEG-DMG o PEG-DMA. In forme di realizzazione particolari, il rapporto molare lipidico è di circa 50/10/38,5/1,5 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-

M104.D1.SM.1DE

DMG, PEG-DSG o PEG-DPG), 57,2/7,1/34,3/1,4 (% in mole di lipide cationico/DPPC/Chol/PEG-cDMA), 40/15/40/5 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DMG), 50/10/35/4,5/0,5 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DSG o GalNAc3-PEG-DSG), 50/10/35/5 (lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DMG), 40/10/40/10 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA), 35/15/40/10 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA) o 52/13/30/5 (% in mole di lipide cationico/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA). In un altro gruppo di forme di realizzazione preferite, il lipide neutro in queste composizioni è sostituito con POPC, DPPC, DOPE o SM. La miscela lipidica è combinata con una soluzione acquosa tamponata che può contenere gli acidi nucleici. La soluzione acquosa tamponata è tipicamente una soluzione in cui il tampone ha un pH inferiore al pK_a del lipide protonabile nella miscela lipidica. Esempi di tamponi adeguati includono citrato, fosfato, acetato, e MES. Un tampone particolarmente preferito è tampone citrato. Tamponi preferiti saranno nell'intervallo di 1-1000 mM dell'anione, a seconda della chimica dell'acido nucleico che viene incapsulato e l'ottimizzazione della concentrazione del tampone può essere significativa per ottenere elevati livelli di carico (si vedano, ad esempio, il brevetto US 6.287.591 e il brevetto US 6.858.225). In alternativa, acqua pura acidificata a pH 5-6 con cloruro, solfato o simili, può essere utile. In tal caso, può essere auspicabile aggiungere il 5% di glucosio, o un altro soluto non ionico che bilancerà il potenziale osmotico attraverso la membrana particellare quando le particelle

M104.D1.SM.1DE

sono dializzate per rimuovere etanolo, aumentare il pH, o miscelate con un veicolante farmaceuticamente accettabile quale soluzione salina normale. La quantità di acido nucleico nel tampone può variare, ma sarà tipicamente da circa 0,01 mg/mL a circa 200 mg/mL, più preferibilmente da circa 0,5 mg/mL a circa 50 mg/mL.

La miscela di lipidi e la soluzione acquosa tamponata di acidi nucleici terapeutici è combinata per fornire una miscela intermedia. La miscela intermedia è tipicamente una miscela di particelle lipidiche aventi acidi nucleici incapsulati. In aggiunta, la miscela intermedia può anche contenere una certa porzione di acidi nucleici che sono attaccati alla superficie delle particelle lipidiche (liposomi o vescicole lipidiche) a causa dell'attrazione ionica degli acidi nucleici di carica negativa e dei lipidi di carica positiva sulla superficie delle particelle lipidiche (gli ammino lipidi o altro lipide che costituisce il primo componente lipidico protonabile sono caricati positivamente in un tampone avente un pH inferiore alla pK_a del gruppo protonabile sul lipide). In un gruppo di forme di realizzazione preferite, la miscela di lipidi è una soluzione alcolica di lipidi e i volumi di ognuna delle soluzioni sono regolati in modo tale che in seguito alla combinazione, il contenuto di alcol risultante sia da circa il 20% in volume a circa il 45% in volume. Il metodo di combinazione delle miscele può includere uno qualsiasi di una varietà di processi, spesso dipendenti dalla scala di formulazione prodotta. Ad esempio, quando il volume totale è di circa 10-20 mL o meno, le soluzioni possono essere combinate in una

M104.D1.SM.1DE

provetta di test e agitate insieme usando un miscelatore a vortice. Processi su larga scala possono essere realizzati in attrezzatura in vetro per scala di produzione adeguata.

Opzionalmente, i complessi lipide-agente terapeutico incapsulato (ad esempio, acido nucleico) che sono prodotti combinando la miscela lipidica e la soluzione acquosa tamponata di agenti terapeutici (acidi nucleici) possono essere dimensionati così da ottenere un intervallo di dimensione desiderato e una distribuzione relativamente ristretta di granulometrie lipidiche. Preferibilmente, le composizioni fornite qui saranno dimensionate a un diametro medio da circa 70 a circa 200 nm, più preferibilmente da circa 90 a circa 130 nm. Parecchie tecniche sono disponibili per dimensionare i liposomi a una dimensione desiderata. Un metodo di dimensionamento è descritto nel brevetto U.S. n. 4.737.323. La sonicazione di una sospensione liposomiale mediante sonicazione in bagno o sonda produce una riduzione dimensionale progressiva fino a vescicole unilamellari piccole (SUV) inferiori a circa 0,05 micron di dimensione. L'omogeneizzazione è un altro metodo che si basa su energia di taglio per frammentare liposomi grandi in liposomi più piccoli. In una procedura di omogeneizzazione tipica, vescicole multilamellari vengono fatte ricircolare attraverso un omogeneizzatore per emulsione standard fino a quando si osservano dimensioni liposomiali selezionate, tipicamente tra circa 0,1 e 0,5 micron. In entrambi i metodi, la distribuzione granulometrica può essere monitorata mediante determinazione granulometrica a fascio laser convenzionale.

M104.D1.SM.1DE

Per alcuni metodi qui, l'estrusione è usata per ottenere una dimensione di vescicola uniforme.

L'estrusione di composizioni liposomiali tramite una membrana di policarbonato a piccoli pori o una membrana di ceramica asimmetrica determina una distribuzione granulometrica relativamente ben definita. Tipicamente, la sospensione è fatta circolare attraverso la membrana una o più volte, fino a quando si raggiunge la distribuzione granulometrica desiderata del complesso liposomiale. I liposomi possono essere estrusi attraverso membrane con pori successivamente più piccoli per ottenere una riduzione graduale della dimensione di liposomi. In alcuni casi, le composizioni di lipide-acido nucleico che sono formate possono essere usate senza alcun dimensionamento.

In particolari forme di realizzazione, i metodi descritti qui comprendono inoltre una fase di neutralizzare almeno una delle cariche di superficie sulle porzioni lipidiche delle composizioni lipide-acido nucleico. Con la neutralizzazione almeno parziale delle cariche superficiali, l'acido nucleico non incapsulato è liberato dalla superficie delle particelle lipidiche e può essere rimosso dalla composizione usando tecniche convenzionali. Preferibilmente, acidi nucleici non incapsulati e assorbiti sulla superficie sono rimossi dalle composizioni risultanti tramite scambio di soluzioni tampone. Ad esempio, la sostituzione di un tampone citrato (pH di circa 4,0, usato per formare le composizioni) con una soluzione salina tamponata con HEPES (pH di HBS di circa 7,5), determina la neutralizzazione della superficie liposomiale e il rilascio di acido

M104.D1.SM.1DE

nucleico dalla superficie. L'acido nucleico rilasciato può quindi essere rimosso tramite cromatografia usando metodi standard e quindi trasformato in un tampone con un pH al di sopra di pKa del lipide usato.

Opzionalmente, le vescicole lipidiche (ossia, particelle lipidiche) possono essere formate mediante idratazione in un tampone acquoso e dimensionate usando uno qualsiasi dei metodi sopra descritti prima dell'addizione dell'acido nucleico. Come sopra descritto, il tampone acquoso dovrebbe essere di un pH al di sotto del pKa dell'amino lipide. Una soluzione degli acidi nucleici può essere quindi addizionata a queste vescicole preformate e dimensionate. Per consentire l'incapsulamento di acidi nucleici in tali vescicole "preformate", la miscela dovrebbe contenere un alcol, quale etanolo. Nel caso di etanolo, esso dovrebbe essere presente a una concentrazione da circa 20% (p/p) a circa 45% (p/p). Inoltre, può essere necessario riscaldare la miscela delle vescicole preformate e l'acido nucleico nella miscela acquosa di tampone-etanolo ad una temperatura da circa 25°C a circa 50°C a seconda della composizione delle vescicole lipidiche e la natura dell'acido nucleico. Risulterà evidente a un esperto ordinario nella tecnica che l'ottimizzazione del processo di incapsulamento per ottenere un livello desiderato di acido nucleico nelle vescicole lipidiche richiederà la manipolazione di una variabile quale la concentrazione e la temperatura dell'etanolo. Esempi di condizioni adeguate per l'incapsulamento dell'acido nucleico sono fornite negli esempi. Una volta che gli

M104.D1.SM.1DE

acidi nucleici sono incapsulati all'interno delle vescicole preformate, il pH esterno può essere aumentato per neutralizzare almeno parzialmente la carica superficiale. Gli acidi nucleici non incapsulati e assorbiti sulla superficie possono quindi essere rimossi come sopra descritto.

Metodo d'uso

Le particelle lipidiche descritte qui possono essere usate per rilasciare un agente terapeutico in una cellula, *in vitro* o *in vivo*. In particolari forme di realizzazione, l'agente terapeutico è un acido nucleico che è rilasciato in una cellula usando una particella acido nucleico-lipide descritta qui. Sebbene la seguente descrizione di vari metodi d'uso delle particelle lipidiche e di composizioni farmaceutiche affini descritte qui sia esemplificata dalla descrizione relativa alle particelle acido nucleico-lipide si comprende che questi metodi e queste composizioni possono essere facilmente adattate per il rilascio di qualsiasi agente terapeutico per il trattamento di qualsiasi malattia o un disturbo che trarrebbe beneficio da tale trattamento.

In alcune forme di realizzazione, sono descritti qui metodi per introdurre un acido nucleico in una cellula. Acidi nucleici preferiti per l'introduzione in cellule sono siRNA, oligonucleotidi immunostimolanti, plasmidi, antisenso e ribozimi. Questi metodi possono essere realizzati mettendo a contatto le particelle o le composizioni descritte qui con le cellule per un periodo di tempo sufficiente affinché si verifichi il rilascio intracellulare.

M104.D1.SM.1DE

Le composizioni descritte qui possono essere assorbite in quasi qualsiasi tipo cellulare, ad esempio, linee di cellule tumorali, incluse, senza limitazione, le linee cellulari HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87, e PC3. Una volta adsorbite, le particelle acido nucleico-lipide possono essere sottoposte a endocitosi da una porzione delle cellule, scambiare i lipidi con le membrane cellulari o fondersi con le cellule. Il trasferimento o l'incorporazione della porzione di acido nucleico del complesso può avvenire tramite una qualsiasi di queste vie. Si ritiene che nel caso di particelle introdotte nella cellula mediante endocitosi, le particelle interagiscano quindi con la membrana endosomiale, determinando destabilizzazione della membrana endosomiale, eventualmente mediante la formazione delle fasi non bistrato, determinando l'introduzione dell'acido nucleico incapsulato nel citoplasma cellulare. Similmente, nel caso di fusione diretta delle particelle con la membrana plasmatica cellulare, quando avviene la fusione, la membrana liposomiale è integrata nella membrana cellulare e il contenuto del liposoma si combina con il fluido intracellulare. Il contatto tra le cellule e le composizioni lipide-acido nucleico, quando realizzato *in vitro* avverrà in un mezzo biologicamente compatibile. La concentrazione di composizioni può variare ampiamente a seconda dell'applicazione particolare, tuttavia generalmente si trova tra circa 1 μmol e circa 10 mmol . In alcune forme di realizzazione, il trattamento delle cellule con le composizioni lipide-acido nucleico sarà generalmente realizzato a

M104.D1.SM.1DE

temperature fisiologiche (circa 37°C) per periodi di tempo da circa 1 a 24 ore, preferibilmente da circa 2 a 8 ore. Per applicazioni *in vitro*, il rilascio di acidi nucleici può avvenire in qualsiasi cellula fatta crescere in coltura, o di origine vegetale o di origine animale, di vertebrato o invertebrato e di qualsiasi tipo o tessuto. In forme di realizzazione preferite, le cellule saranno cellule di animali, in modo maggiormente preferito cellule di mammifero, e in modo massimamente preferito cellule umane.

In un gruppo di forme di realizzazione, una sospensione di particelle lipide-acido nucleico è addizionata a 60-80% di cellule piastrate confluenti aventi una densità cellulare da circa 10^3 a circa 10^5 cellule/mL, più preferibilmente circa 2×10^4 cellule/mL. La concentrazione della sospensione addizionata alle cellule è preferibilmente da circa 0,01 a 20 µg/mL, più preferibilmente circa 1 µg/mL.

Applicazioni tipiche includono l'uso di procedure ben note per fornire il rilascio intracellulare di siRNA per abbattere o silenziare bersagli cellulari specifici. Applicazioni alternative includono il rilascio di sequenze di DNA o mRNA che codificano peptidi terapeuticamente utili. In questo modo, si fornisce terapia, per malattie genetiche fornendo prodotti di geni deficienti o assenti (ossia, per la distrofia di Duchenne, si veda Kunkel, *et al.*, *Brit. Med. Bull.* 45(3):630-643 (1989), e per la fibrosi cistica, si veda Goodfellow, *Nature* 341:102-103 (1989)). Altri usi per le composizioni descritte qui, includono l'introduzione di oligonucleotidi antisense

M104.D1.SM.1DE

nelle cellule (si veda, Bennett, *et al.*, *Mol. Pharm.* 41:1023-1033 (1992)).

In alternativa, le composizioni descritte qui possono anche essere usate per il rilascio di acidi nucleici in cellule *in vivo*, usando metodi che sono noti agli esperti nella tecnica. Relativamente all'applicazione dell'invenzione per il rilascio di sequenze di DNA o mRNA, Zhu, *et al.*, *Science* 261:209-211 (1993), descrive il rilascio endovenoso del plasmide di espressione del citomegalovirus (CMV)-cloramfenicol acetiltransferasi (CAT) usando complessi DOTMA-DOPE. Hyde, *et al.*, *Nature* 362:250-256 (1993), descrive il rilascio del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) nell'epitelio delle vie aeree e negli alveoli nel polmone di topi con l'uso di liposomi. Brigham, *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281 (1989), descrive la transfezione *in vivo* di polmoni di topi con un gene procariotico funzionante codificante l'enzima intracellulare cloramfenicol acetiltransferasi (CAT). Pertanto, le composizioni descritte qui possono essere usate nel trattamento di malattie infettive.

Pertanto, in un altro aspetto, le formulazioni descritte qui possono essere usate per silenziare o modulare un gene bersaglio come, ma senza limitazione FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gene PDGF beta, gene Erb-B, gene Src, gene CRK, gene GRB2, gene RAS, gene MEKK, gene JNK, gene RAF, gene Erk1/2, gene PCNA(p21), gene MYB, gene JUN, gene FOS, gene BCL-2, gene ciclina D, gene VEGF, gene EGFR, gene ciclina A, gene ciclina E, gene WNT-1, gene beta-catenina,

M104.D1.SM.1DE

gene c-MET, gene PKC, gene NFkB, gene STAT3, gene survivina, gene Her2/Neu, gene topoisomerasi I, gene alfa topoisomerasi II, gene p73, gene p21(WAF1/CIP1), gene p27(KIP1), gene PPM1D, gene RAS, gene caveolina I, gene MIB I, gene MTAI, gene M68, geni soppressori tumorali, gene soppressore tumorale p53, membro della famiglia p53 DN-p63, gene soppressore tumorale pRb, gene soppressore tumorale APC1, gene soppressore tumorale BRCA1, gene soppressore tumorale PTEN, gene di fusione mLL, gene di fusione BCR/ABL, gene di fusione TEL/AML1, gene di fusione EWS/FLI1, gene di fusione TLS/FUS1, gene di fusione PAX3/FKHR, gene di fusione AML1/ETO, gene alfa v-integrina, gene del recettore Flt-1, gene tubulina, gene Papilloma Virus umano, un gene necessario per la replicazione del Papilloma Virus umano, gene del virus dell'immunodeficienza umana, un gene necessario per la replicazione del virus dell'immunodeficienza umana, il gene del virus dell'epatite A, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite A, gene del virus dell'epatite B, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite B, gene del virus dell'epatite C, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite C, gene del virus dell'epatite D, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite D, gene del virus dell'epatite E, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite E, gene del virus dell'epatite F, un gene necessario per la replicazione del virus dell'epatite F, gene del virus dell'epatite G, un gene necessario per la replicazione dell'epatite G, gene del virus dell'epatite H, un gene necessario per la replicazione dell'epatite

M104.D1.SM.1DE

H, gene del virus respiratorio sinciziale, un gene che è necessario per la replicazione del virus respiratorio sinciziale, gene dell'Herpes Simplex Virus, un gene necessario per la replicazione dell'Herpes Simplex Virus, gene dell'herpes Citomegalovirus, un gene che è necessario per la replicazione dell'herpes Citomegalovirus, gene dell'Epstein Barr herpes virus, un gene che è necessario per la replicazione dell'Epstein Barr herpes virus, gene dell'herpes virus associato al sarcoma di Kaposi, un gene che è necessario per la replicazione dell'herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi, gene del JC Virus, un gene umano che è necessario per la replicazione del JC Virus, gene del mixovirus, un gene che è necessario per la replicazione del gene del mixovirus, gene del rinovirus, un gene che è necessario per la replicazione del rinovirus, gene del coronavirus, un gene necessario per la replicazione del coronavirus, gene del virus West Nile, un gene necessario per la replicazione del virus West Nile, gene dell'encefalite di St. Louis, un gene necessario per la replicazione dell'encefalite di St. Louis, gene del virus dell'encefalite portato dalle zecche, un gene necessario per la replicazione del virus dell'encefalite portato dalle zecche, gene del virus dell'encefalite di Murray Valley, un gene necessario per la replicazione del virus dell'encefalite di Murray Valley, gene del virus dengue, un gene necessario per la replicazione del virus dengue, gene del Simian Virus 40, un gene necessario per la replicazione del Simian Virus 40, gene del virus umano linfotropo delle cellule T, un gene necessario per la replicazione del virus

M104.D1.SM.1DE

umano linfotropo delle cellule T, gene del virus della leucemia murina di Moloney, un gene necessario per la replicazione del virus della leucemia murina di Moloney, gene del virus dell'encefalomiocardite, un gene necessario per la replicazione del virus dell'encefalomiocardite, gene del virus del morbillo, un gene necessario per la replicazione del virus del morbillo, gene del zoster virus della varicella, un gene necessario per la replicazione del zoster virus della varicella, gene dell'adenovirus, un gene necessario per la replicazione dell'adenovirus, gene del virus della febbre gialla, un gene necessario per la replicazione del virus della febbre gialla, gene del poliovirus, un gene necessario per la replicazione del poliovirus, gene del virus del vaiolo, un gene necessario per la replicazione del virus del vaiolo, gene Plasmodium, un gene necessario per la replicazione del gene Plasmodium, gene del Mycobacterium ulcerans, un gene necessario per la replicazione del Mycobacterium ulcerans, gene del Mycobacterium tuberculosis, un gene necessario per la replicazione del Mycobacterium tuberculosis, gene del Mycobacterium leprae, un gene necessario per la replicazione del Mycobacterium leprae, gene dello Staphylococcus aureus, un gene necessario per la replicazione dello Staphylococcus aureus, gene dello Streptococcus pneumoniae, un gene necessario per la replicazione dello Streptococcus pneumoniae, gene dello Streptococcus pyogenes, un gene necessario per la replicazione dello Streptococcus pyogenes, gene della Chlamydia pneumoniae, un gene necessario per la replicazione della Chlamydia pneumoniae, gene del Mycoplasma

M104.D1.SM.1DE

pneumoniae, un gene necessario per la replicazione del *Mycoplasma pneumoniae*, un gene dell'integrina, un gene della selectina, un gene del sistema del complemento, un gene della chemochina, gene del recettore della chemochina, gene GCSF, gene Gro1, gene Gro2, gene Gro3, gene PF4, gene MIG, gene Pro-Platelet Basic Protein, gene MIP-1I, gene MIP-1J, gene RANTES, gene MCP-1, gene MCP-2, gene MCP-3, gene CMBKR1, gene CMBKR2, gene CMBKR3, CMBKR5v, gene AIF-1, gene I-309, un gene di un componente di un canale degli ioni, un gene del recettore dei neurotrasmettitori, un gene del ligando dei neurotrasmettitori, il gene della famiglia amiloide, il gene della presenilina, gene HD, gene DRPLA, gene SCA1, gene SCA2, gene MJD1, gene CACNL1A4, gene SCA7, gene SCA8, gene dell'allele trovato nelle cellule LOH, o un gene dell'allele di un gene polimorfico.

Per la somministrazione *in vivo*, le composizioni farmaceutiche sono preferibilmente somministrate per via parenterale, ossia intra-articolare, endovenosa, intraperitoneale, sottocutanea, o intramuscolare. In particolari forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche sono somministrate per via endovenosa o intraperitoneale mediante un'iniezione in bolo. Per un esempio, si veda Stadler, *et al.*, brevetto U.S. n. 5.286.634. Il rilascio di acido nucleico intracellulare è anche stato descritto in Straubinger, *et al.*, METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101:512-527 (1983); Mannino, *et al.*, *Biotechniques* 6:682-690 (1988); Nicolau, *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6:239-271 (1989), e Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Ulteriori metodi di

M104.D1.SM.1DE

somministrazione di agenti terapeutici a base di lipidi sono descritti, ad esempio, in Rahman *et al.*, brevetto U.S. n. 3.993.754; Sears, brevetto U.S. n. 4.145.410; Papahadjopoulos *et al.*, brevetto U.S. n. 4.235.871; Schneider, brevetto U.S. n. 4.224.179; Lenk *et al.*, brevetto U.S. n. 4.522.803; e Fountain *et al.*, brevetto U.S. n. 4.588.578.

In altri metodi, le preparazioni farmaceutiche possono essere messe a contatto con il tessuto bersaglio mediante applicazione diretta della preparazione sul tessuto. L'applicazione può essere realizzata mediante procedure "aperte" o "chiuse" topiche. Con "topico", si intende l'applicazione diretta della preparazione farmaceutica su un tessuto esposto all'ambiente, quale la cute, l'orofaringe, il canale uditivo esterno e simili. Procedure "aperte" sono le procedure che includono l'incisione della cute di un paziente e la visualizzazione diretta del tessuto sottostante su cui sono applicate le preparazioni farmaceutiche. Ciò è generalmente effettuato con una procedura chirurgica quale una toracotomia per accedere ai polmoni, laparotomia addominale per accedere alle viscere addominali o altro approccio chirurgico diretto per il tessuto bersaglio. Procedure "chiuse" sono procedure invasive in cui i tessuti bersaglio interni non sono direttamente visualizzati, ma a cui si accede tramite inserimento di strumenti attraverso piccole ferite nella cute. Ad esempio, le preparazioni possono essere somministrate nel peritoneo mediante lavaggio con ago. Similmente, le preparazioni farmaceutiche possono essere somministrate alle meningi

M104.D1.SM.1DE

o al midollo spinale mediante infusione durante una puntura lombare con successivo adeguato posizionamento del paziente come comunemente effettuato per anestesia spinale o imagingografia con metrazamide del midollo spinale. In alternativa, le preparazioni possono essere somministrate tramite dispositivi endoscopici.

Le composizioni lipide-acido nucleico possono anche essere somministrate in un aerosol inalato nei polmoni (si veda, Brigham, et al., *Am. J. Sci.* 298(4):278-281 (1989)) o mediante iniezione diretta sul sito della malattia (Culver, *Human Gene Therapy*, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, New York, pagg. 70-71 (1994)).

I metodi descritti qui possono essere realizzati in una varietà di ospiti. Ospiti preferiti includono specie di mammifero quali esseri umani, primati non umani, cani, gatti, bovini, cavalli, pecore e simili.

Dosaggi per le particelle di lipide-agente terapeutico descritte qui dipenderanno dal rapporto agente terapeutico/lipide e dal parere del medico che le somministra in base all'età, al peso e alla condizione del paziente.

In una forma di realizzazione, è descritto qui un metodo di modulazione dell'espressione di un polinucleotide o polipeptide bersaglio. Questi metodi comprendono in generale mettere a contatto una cellula con una particella lipidica descritta qui che è associata a un acido nucleico in grado di modulare l'espressione di un polinucleotide o polipeptide bersaglio. Come usato qui, il termine "modulare" si riferisce all'alterazione dell'espressione di un

M104.D1.SM.1DE

polinucleotide o polipeptide bersaglio. In forme di realizzazione diverse, la modulazione può indicare l'aumento o il potenziamento o può indicare la diminuzione o la riduzione. Metodi di misurazione del livello dell'espressione di un polinucleotide o polipeptide bersaglio sono noti e disponibili nelle tecniche e includono, ad esempio, metodi che impiegano la reazione a catena della trascrizione-polimerasi inversa (RT-PCR) e tecniche immunoistochimiche. In particolari forme di realizzazione, il livello dell'espressione di un polinucleotide o polipeptide bersaglio è aumentato o ridotto di almeno 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o più del 50% rispetto a un valore di controllo adeguato.

Ad esempio, se si desidera l'espressione aumentata di un polipeptide, l'acido nucleico può essere un vettore di espressione che include un polinucleotide che codifica il polipeptide desiderato. D'altro canto, se è desiderata l'espressione ridotta di un polinucleotide o polipeptide, allora l'acido nucleico può essere, ad esempio, un oligonucleotide antisense, siRNA, o un microRNA che comprende una sequenza polinucleotidica che ibrida in modo specifico con un polinucleotide che codifica il polipeptide bersaglio, distruggendo così l'espressione del polinucleotide o del polipeptide bersaglio. In alternativa, l'acido nucleico può essere un plasmide che esprime un tale oligonucleotide antisense, siRNA, o microRNA.

In una particolare forma di realizzazione, è descritto qui un metodo di modulazione dell'espressione di un polipeptide da parte di una cellula, comprendente fornire a una cellula una particella

M104.D1.SM.1DE

lipidica che consiste o consiste sostanzialmente di un lipide cationico di formula I, un lipide neutro, uno sterolo, un lipide PEG o PEG-modificato, ad esempio, in un rapporto molare di circa 20-65% di lipide cationico di formula I, 3-25% di lipide neutro, 15-55% di sterolo, e 0,5-15% del lipide PEG o PEG-modificato, in cui la particella lipidica è associata con un acido nucleico in grado di modulare l'espressione del polipeptide. In particolari forme di realizzazione, il rapporto lipidico molare è all'incirca 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 40/15/40/5, o 35/15/40/10 (% in mole di lipide cationico di formula I/DSPC o DPPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA). In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica include anche una frazione caratteristica di bersagliamento, quale un lipide di bersagliamento descritto qui (ad esempio, la particella lipidica consiste sostanzialmente in un lipide cationico di formula I, un lipide neutro, uno sterolo, un lipide PEG o PEG-modificato e una frazione caratteristica di bersagliamento). In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide neutro in queste composizioni è sostituito con DPPC, POPC, DOPE o SM. In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide PEG o PEG-modificato è sostituito con PEG-DSG, PEG-DMG o PEG-DPG.

In particolari forme di realizzazione, l'agente terapeutico è selezionato tra un siRNA, un microRNA, un oligonucleotide antisense e un plasmide in grado di esprimere un siRNA, un microRNA o un oligonucleotide antisense, e in cui siRNA, il microRNA o RNA

M104.D1.SM.1DE

antisense comprende un polinucleotide che si lega in modo specifico a un polinucleotide che codifica il polipeptide o un suo complemento, in modo tale che l'espressione del polipeptide sia ridotta.

In altre forme di realizzazione, l'acido nucleico è un plasmide che codifica il polipeptide o una sua variante o frammento funzionale in modo tale che l'espressione del polipeptide o la variante funzionale o suo frammento sia aumentato.

In forme di realizzazione affini, sono descritti qui reagenti utili per la transfezione di cellule in coltura. Ad esempio, le formulazioni lipidiche descritte qui possono essere usate per rilasciare acidi nucleici alle cellule in coltura (ad esempio, cellule aderenti, cellule in sospensione, ecc.).

In forme di realizzazione correlate, è descritto qui un metodo di trattamento di una malattia o di un disturbo caratterizzato dalla sovraespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto una composizione farmaceutica descritta qui, in cui l'agente terapeutico è selezionato tra un siRNA, un microRNA, un oligonucleotide antisense, e un plasmide in grado di esprimere un siRNA, un microRNA, o un oligonucleotide antisense, e in cui siRNA, microRNA o RNA antisense comprende un polinucleotide che si lega in modo specifico a un polinucleotide che codifica il polipeptide o un suo complemento.

In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende una particella lipidica che consiste o consiste sostanzialmente in un lipide cationico di formula I, DSPC, Chol e

M104.D1.SM.1DE

PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, ad esempio, in un rapporto molare di circa 20-65% del lipide cationico di formula I, 3-25% del lipide neutro, 15-55% di sterolo, e 0,5-15% del lipide PEG o PEG-modificato PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, in cui la particella lipidica è associata all'acido nucleico terapeutico. In particolari forme di realizzazione, il rapporto molare lipidico è all'incirca 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 o 40/15/40/5 (% in mole di lipide cationico di formula I/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA). In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica include anche un lipide di bersagliamento descritto qui (ad esempio, la particella lipidica consiste sostanzialmente in un lipide cationico di formula I, un lipide neutro, uno sterolo, un lipide PEG o PEG-modificato e una frazione caratteristica di bersagliamento (ad esempio, GalNAc3-PEG-DSG)). In alcune forme di realizzazione, quando il lipide di bersagliamento include una frazione caratteristica PEG ed è addizionato a una formulazione liposomiale esistente, la quantità di lipide PEG-modificato è ridotta in modo tale che la quantità totale del lipide PEG-modificato (ossia, lipide PEG-modificato, ad esempio PEG-DMG, e il lipide di bersagliamento contenente PEG) è mantenuto a una percentuale in mole costante (ad esempio, 0,3%, 1,5% in mole, o 3,5% in mole). In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide neutro in queste composizioni è sostituito con DPPC, POPC, DOPE o SM. In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide PEG o PEG-modificato è sostituito con PEG-

M104.D1.SM.1DE

DSG o PEG-DPG. In un'altra forma di realizzazione associata è descritto qui un metodo di trattamento di una malattia o un disturbo caratterizzato dalla sottoespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto una composizione farmaceutica descritta qui, in cui l'agente terapeutico è un plasmide che codifica il polipeptide o una variante funzionale o suo frammento.

Qui è ulteriormente descritto un metodo di induzione di una risposta immunitaria in un soggetto comprendente fornire al soggetto la composizione farmaceutica descritta qui, in cui l'agente terapeutico è un oligonucleotide immunostimolatorio. In alcune forme di realizzazione, la risposta immunitaria è una risposta immunitaria umorale o mucosale che consiste o consiste sostanzialmente di un lipide cationico di formula I, DSPC, Chol e PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, ad esempio, in un rapporto molare di circa 20-65% di lipide cationico di formula I, 3-25% di lipide neutro, 15-55% di sterolo, e 0,5-15% del lipide PEG o PEG-modificato PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, in cui la particella lipidica è associata all'acido nucleico terapeutico. In particolari forme di realizzazione, il rapporto molare lipidico è all'incirca 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 o 40/15/40/5 (% in mole di lipide cationico di formula I/DSPC/Chol/PEG-DMG o PEG-cDMA). In alcune forme di realizzazione, la particella lipidica include anche un lipide di bersagliamento descritto qui (ad esempio, la particella lipidica

M104.D1.SM.1DE

contiste sostanzialmente di un lipide cationico di formula I, un lipide neutro, uno sterolo, un lipide PEG o PEG-modificato e una frazione caratteristica di bersagliamento). In alcune forme di realizzazione, quando il lipide di bersagliamento include una frazione caratteristica PEG ed è addizionato a una formulazione liposomiale esistente, la quantità del lipide PEG-modificato è ridotta in modo tale che la quantità totale del lipide PEG-modificato (ossia, lipide PEG-modificato, ad esempio, PEG-DMG, e il lipide di bersagliamento contenente PEG) sia mantenuta a una percentuale in mole costante (ad esempio, 0,3%, 1,5% in mole, o 3,5% in mole). In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide neutro in queste composizioni è sostituito con DPPC, POPC, DOPE o SM. In un altro gruppo di forme di realizzazione, il lipide PEG o PEG-modificato è sostituito con PEG-DSG o PEG-DPG. In altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica è fornita al soggetto in combinazione con un vaccino o un antigene. Pertanto, sono forniti qui vaccini comprendenti una particella lipidica descritta qui che comprende un oligonucleotide immunostimolatore ed è anche associata a un antigene per cui si desidera una risposta immunitaria. In particolari forme di realizzazione, l'antigene è un antigene tumorale o è associato a un agente infettivo quale, ad esempio, un virus, un batterio o un parassita.

Una varietà di antigeni tumorali, antigeni di agenti infettivi e antigeni associati ad altra malattia, sono ben noti nella tecnica ed esempi di questi sono descritti nei riferimenti citati qui. Esempi di

M104.D1.SM.1DE

antigeni adeguati per uso qui includono, senza limitazione, antigeni polipeptidici e antigeni di DNA. Esempi specifici di antigeni sono antigene dell'epatite A, epatite B, del vaiolo, della polio, dell'antrace, dell'influenza, del tifo, del tetano, del morbillo, del rotavirus, della difterite, della pertosse, della tubercolosi e della rosolia. In una forma di realizzazione, l'antigene è un antigene ricombinante dell'epatite B. In altri aspetti, l'antigene è un antigene ricombinante dell'epatite A. In un altro aspetto, l'antigene è un antigene tumorale. Esempi di tali antigeni tumore-associati sono l'antigene MUC-1, EBV e antigeni associati al linfoma di Burkitt. In un ulteriore aspetto, l'antigene è un antigene ricombinante dell'antigene del tumore della proteina tirosinasi associata. Gli esperti nella tecnica saranno a conoscenza di ulteriori antigeni adeguati.

Gli antigeni tumore-associati adeguati per uso qui includono molecole sia mutate sia non mutate che possono essere indicative di un singolo tipo di tumore, condiviso tra parecchi tipi di tumori e/o espresso o sovraespresso in modo esclusivo in cellule tumorali rispetto a cellule normali. Oltre alle proteine e alle glicoproteine, pattern tumore-specifici di espressione di carboidrati, gangliosidi, glicolipidi e mucine sono anche stati documentati. Antigeni tumore-associati esemplificativi per l'uso nei vaccini anticancro in oggetto includono prodotti proteici di oncogeni, geni soppressori tumorali e altri geni con mutazioni o riarrangiamenti unici per le cellule tumorali, prodotti genici embrionali riattivati, antigeni oncofetali,

M104.D1.SM.1DE

antigeni di differenziazione tessuto-specifica (ma non tumore-specifica), recettori del fattore di crescita, residui di carboidrato della superficie cellulare, proteine virali estranee e una serie di altre auto proteine.

Forme di realizzazione specifiche degli antigeni tumore-associati, includono, ad esempio, antigeni mutati quali prodotti proteici dei protooncogeni Ras p21, del soppressore tumorale p53 e degli oncogeni BCR-abl, nonché CDK4, MUM1, Caspasi 8, e Beta catenina; antigeni sovraespressi quali galectina 4, galectina 9, anidrasi carbonica, Aldolasi A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 e KSA, antigeni oncofetali quali alfa fetoproteina (AFP), gonadotropina corionica umana (hCG); autoantigeni quale l'antigene carcino-embrionico (CEA) e antigeni di differenziazione dei melanociti quali Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinasi, TRP1 e TRP2; antigeni prostata-associati quali PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 e PSM-P2; prodotti genici embrionali riattivati quali MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, e altri antigeni del cancro al testicolo, quali NY-ESO1, SSX2 e SCP1; mucine quali Muc-1 e Muc-2; gangliosidi quali GM2, GD2 e GD3, glicolipidi neutri e glicoproteine quali Lewis (y) e globo-H; e glicoproteine quali Tn, antigene di Thompson-Freidenreich (TF) e sTn. Sono anche inclusi come antigeni tumore-associati qui lisati di cellule intere e di cellule tumorali nonché loro porzioni immunogene, nonché idiotipi immunoglobulinici espressi su proliferazioni monoclonali dei linfociti B per l'uso contro i linfomi a cellule B.

M104.D1.SM.1DE

I patogeni includono, senza limitazione, agenti infettivi, ad esempio, virus che infettano mammiferi e più in particolare esseri umani. Esempi di virus infettivi includono, senza limitazione: Retroviridae (ad esempio, virus dell'immunodeficienza umana, quali HIV-1 (indicato anche come HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o HIV-III; e altri isolati, quali HIV-LP; Picornaviridae (ad esempio, virus della poliomielite, virus dell'epatite A; enterovirus, virus Cocksackie umano, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (ad esempio, ceppi che causano la gastroenterite); Togaviridae (ad esempio, virus dell'encefalite equina, virus della rosolia); Flaviridae (ad esempio, virus dengue, virus dell'encefalite, virus della febbre gialla); Coronaviridae (ad esempio, coronavirus); Rhabdoviridae (ad esempio, virus della stomatite vescicolare, virus della rabbia); Coronaviridae (ad esempio, coronavirus); Rhabdoviridae (ad esempio, virus della stomatite vescicolare, virus della rabbia); Filoviridae (ad esempio, virus dell'ebola); Paramyxoviridae (ad esempio, virus della parainfluenza, virus della parotite, virus del morbillo, virus respiratorio sinciziale); Orthomyxoviridae (ad esempio, virus dell'influenza); Bungaviridae (ad esempio, virus Hantaan, bunga virus, phlebovirus e Nairo virus); Arena viridae (virus della febbre emorragica); Reoviridae (ad esempio, reovirus, orbivirus e rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus dell'epatite B); Parvovirida (parvovirus); Papovaviridae (papilloma virus, polioma virus); Adenoviridae (la maggior parte degli adenovirus); herpes simplex virus Herpesviridae (HSV) 1 e 2, virus zoster della

M104.D1.SM.1DE

varicella, citomegalovirus (CMV), herpes virus; Poxviridae (virus del vaiolo, virus del vaccino, pox virus); e Iridoviridae (ad esempio, virus della febbre suina africana); e virus non classificati (ad esempio, agenti eziologici delle encefalopatie spongiformi, l'agente dell'epatite delta (considerato un satellite difettivo del virus dell'epatite B), gli agenti dell'epatite non-A, non-B (classe 1=trasmessi internamente; classe 2=trasmessi a livello parenterale (ossia, epatite C); virus Norwalk e affini e astrovirus).

Inoltre, batteri gram-negativi e gram-positivi servono come antigeni in animali vertebrati. Tali batteri gram-positivi includono, senza limitazione, la specie *Pasteurella*, la specie *Staphylococci*, e la specie *Streptococcus*. Batteri gram-negativi includono, senza limitazione, *Escherichia coli*, specie *Pseudomonas*, e specie *Salmonella*. Esempi specifici di batteri infettivi includono, senza limitazione: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (ad esempio, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Gruppo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Gruppo B), *Streptococcus* (gruppo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium*

M104.D1.SM.1DE

tetani, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, e *Actinomyces israelii*.

Esempi aggiuntivi di patogeni includono, senza limitazione, funghi infettivi che infettano mammiferi, e più in particolare esseri umani. Esempi di funghi infettivi includono, senza limitazione: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Esempi di parassiti infettivi includono *Plasmodium* quali *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, e *Plasmodium vivax*. Altri organismi infettivi (ossia, protisti) includono *Toxoplasma gondii*.

Composizioni farmaceutiche

In una forma di realizzazione, sono descritte qui composizioni farmaceutiche comprendenti un agente di acido nucleico identificato dal modello di screening epatico descritto qui. La composizione include l'agente, ad esempio, un dsRNA, e un veicolo farmaceuticamente accettabile. La composizione farmaceutica è utile per trattare una malattia o un disturbo associato all'espressione o l'attività del gene. Tali composizioni farmaceutiche sono formulate in base alla modalità di rilascio. Un esempio sono composizioni che sono formulate per la somministrazione sistemica attraverso il rilascio parenterale. Composizioni farmaceutiche incluso l'agente identificato sono somministrate in dosaggi sufficienti a inibire

M104.D1.SM.1DE

l'espressione del gene bersaglio, ad esempio, il gene del fattore VII. In generale, una dose adeguata di agente dsRNA sarà nell'intervallo da 0,01 a 5,0 milligrammi per chilogrammo di peso corporeo del ricevente per giorno, in generale nell'intervallo da 1 microgrammo a 1 mg per chilogrammo di peso corporeo al giorno. La composizione farmaceutica può essere somministrata una volta al giorno, oppure il dsRNA può essere somministrato come due, tre, o più sotto-dosi a intervalli adeguati in tutta la giornata o anche usando infusione continua o rilascio attraverso una formulazione a rilascio controllato. In tal caso, il dsRNA contenuto in ogni sotto-dose deve essere corrispondentemente più piccolo al fine di ottenere il dosaggio giornaliero totale. L'unità di dosaggio può anche essere compoundizzata per il rilascio su parecchi giorni. Ad esempio usando una formulazione a rilascio sostenuto convenzionale che fornisce il rilascio sostenuto del dsRNA per un periodo di parecchi giorni. Formulazioni a rilascio sostenuto sono ben note nella tecnica e sono particolarmente utili per il rilascio vaginale di agenti, come potrebbero essere usati con agenti descritti qui. In questa forma di realizzazione, l'unità di dosaggio contiene un multiplo corrispondente alla dose giornaliera.

L'esperto apprezzerà che alcuni fattori possono influenzare il dosaggio e la temporizzazione necessaria per trattare efficacemente un soggetto inclusi, senza limitazione, la gravità della malattia o del disturbo, i precedenti trattamenti, la salute generale e/o l'età del soggetto e altre malattie presenti. Inoltre, il trattamento di un

M104.D1.SM.1DE

soggetto con una quantità terapeuticamente efficace di una composizione può includere un singolo trattamento o una serie di trattamenti. Stime di dosaggi efficaci e di emivite in vivo per i singoli dsRNA descritti qui possono essere effettuate usando metodologie convenzionali o sulla base di test in vivo usando un modello animale adeguato, come descritto altrove qui.

In particolari forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche comprendenti le particelle di lipide-acido nucleico descritte qui sono preparate secondo tecniche standard e comprendono inoltre un veicolo farmaceuticamente accettabile. In generale si impiegherà soluzione salina normale come veicolo farmaceuticamente accettabile. Altri veicoli adeguati includono, ad esempio, acqua, acqua tamponata, soluzione salina allo 0,9%, glicina allo 0,3% e simili, incluse glicoproteine per stabilità potenziata, quali albumina, lipoproteina, globulina, ecc. In composizioni comprendenti soluzione salina e altri veicoli contenenti sali, il veicolo è preferibilmente addizionato successivamente alla formazione di particelle lipidiche. Pertanto, dopo che si sono formate le composizioni lipide-acido nucleico, le composizioni possono essere diluite in veicoli farmaceuticamente accettabili come soluzione salina normale.

Le risultanti preparazioni farmaceutiche possono essere sterilizzate mediante tecniche di sterilizzazione ben note convenzionali. Le soluzioni acquose possono quindi essere confezionate per uso o filtrate in condizioni asettiche e

M104.D1.SM.1DE

liofilizzate, la preparazione liofilizzata essendo combinata con una soluzione acquosa sterile prima della somministrazione. Le composizioni possono contenere sostanze ausiliarie farmaceuticamente accettabili come necessario per avvicinarsi alle condizioni fisiologiche, quali agenti della regolazione del pH e tampone, agenti di regolazione della tonicità e simili, ad esempio, acetato di sodio, lattato di sodio, cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, ecc. In aggiunta, la sospensione lipidica può includere agenti lipide-protettivi che proteggono i lipidi dai danni dei radicali liberi e lipidi-perossidativi durante la conservazione. Agenti di spegnimento dei radicali liberi lipofili quali α -tocoferolo e chelanti specifici del ferro idrosolubili, quali ferriossammina sono adeguati.

La concentrazione di particella lipidica o di particella lipide-acido nucleico nelle formulazioni farmaceutiche può variare ampiamente, ossia da meno di circa 0,01%, solitamente ad o almeno circa 0,05-5% fino a 10-30% in peso e saranno selezionate principalmente per i volumi di fluido, viscosità ecc., secondo la particolare modalità di somministrazione selezionata. Ad esempio, la concentrazione può essere aumentata per ridurre il carico di fluido associato al trattamento. Ciò può essere particolarmente desiderabile in pazienti aventi insufficienza cardiaca congestizia associata ad aterosclerosi o grave ipertensione. In alternativa, i complessi costituiti da lipidi irritanti possono essere diluiti a basse concentrazioni per ridurre l'inflammatione sul sito di

M104.D1.SM.1DE

somministrazione. In un gruppo di forme di realizzazione, l'acido nucleico avrà un tracciante attaccato e sarà usato per la diagnosi (indicando la presenza di acido nucleico complementare). In questo caso, la quantità di complessi somministrati dipenderà dal particolare tracciante usato, dallo stato della malattia diagnosticato e dalla valutazione del medico, ma in generale sarà tra circa 0,01 e circa 50 mg per chilogrammo di peso corporeo (ad esempio, dell'agente di acido nucleico), preferibilmente tra circa 0,1 e circa 5 mg/kg di peso corporeo. In alcune forme di realizzazione, un complesso somministrato include da circa 0,004 a circa 50 mg per chilogrammo di peso corporeo di agente di acido nucleico (ad esempio, da circa 0,006 mg/kg a circa 0,2 mg/kg).

Come sopra indicato, le particelle lipide-agente terapeutico (ad esempio, acido nucleico) descritte qui, possono includere fosfolipidi polietilen glicole (PEG)-modificati, PEG-ceramide, o lipidi ganglioside G_{M1} -modificati o altri lipidi efficaci a prevenire o limitare l'aggregazione. L'aggiunta di tali componenti non previene semplicemente l'aggregazione del complesso. Piuttosto può anche fornire un mezzo per aumentare la durata di vita in circolazione e aumentare il rilascio della composizione lipide-acido nucleico nei tessuti bersaglio.

Sono anche descritte qui composizioni lipide-agente terapeutico sotto forma di kit. Il kit sarà tipicamente costituito da un contenitore che è compartimentalizzato per contenere i vari elementi del kit. Il kit conterrà le particelle o le composizioni

M104.D1.SM.1DE

farmaceutiche descritte qui, preferibilmente nella forma disidratata o concentrata, con istruzioni per la loro reidratazione o diluizione e somministrazione. In alcune forme di realizzazione, le particelle comprendono il principio attivo, mentre in altre forme di realizzazione no.

Le composizioni farmaceutiche contenenti un agente identificato dal modello di screening epatico possono essere somministrati in una serie di modi a seconda del fatto che si desideri trattamento locale o sistemico e in base all'area da trattare. La somministrazione può essere topica, polmonare, ad esempio mediante inalazione o insufflazione di polveri o aerosol, incluso mediante nebulizzatore, endotracheale, intranasale, epidermica e transdermica), orale o parenterale. La somministrazione può anche essere progettata così da determinare una localizzazione preferenziale in particolari tessuti attraverso rilascio locale, ad esempio mediante iniezione intrarticolare diretta nelle articolazioni, mediante somministrazione rettale per il rilascio diretto nelle viscere e nell'intestino, mediante somministrazione intravaginale per il rilascio nella cervice e nella vagina, mediante somministrazione intravitreale per il rilascio nell'occhio. La somministrazione parenterale include iniezione o infusione endovenosa, intrarteriale, intrarticolare, sottocutanea, intraperitoneale o intramuscolare; o somministrazione intracraniale, ad esempio, intratecale o intraventricolare.

Composizioni e formulazioni farmaceutiche per la somministrazione topica possono includere cerotti transdermici,

M104.D1.SM.1DE

unguenti, lozioni, creme, gel, gocce, supposte, spray, liquidi e polveri. Veicoli farmaceutici convenzionali, basi acquose, polverose o oleose, addensanti e simili possono essere necessari o desiderabili. Preservativi rivestiti, guanti e simili possono anche essere utili. Formulazioni topiche preferite includono quelle in cui i dsRNA descritti qui sono in miscela con un componente di rilascio topico quale lipide, liposoma, acido grasso, estere di acido grasso, steroide, agente chelante o tensioattivo. Lipidi e liposomi preferiti includono quelli neutri (ad esempio dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), dimiristoilfosfatidil colina (DMPC), distearoil-fosfatidil colina) negativi (ad esempio dimiristoilfosfatidil glicerolo, o DMPG) e cationici (ad esempio dioleoil-tetrametil-amminopropile DOTAP e dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). I dsRNA descritti qui possono essere incapsulati all'interno di liposomi o possono formare complessi con essi, in particolare liposomi cationici. In alternativa, i dsRNA possono essere complessati con lipidi, in particolare con lipidi cationici. Acidi grassi ed esteri preferiti includono senza limitazione, acido arachidonico, acido oleico, acido eicosanoico, acido laurico, acido caprilico, acido caprico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido linoleico, acido linolenico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilaza-cicloeptan-2-one, un'acilcarnitina, un'acilcolina o un C₁₋₁₀ alchil estere (ad esempio isopropilmiristato IPM), monogliceride, digliceride o loro sale farmaceuticamente accettabile. Formulazioni topiche sono descritte in dettaglio nella

M104.D1.SM.1DE

domanda di brevetto U.S. Seriale n. 09/315.298 depositata il 20 maggio 1999.

Composizioni e formulazioni per la somministrazione orale includono polveri o granuli, microparticolati, nanoparticolati, sospensioni o soluzioni in acqua o mezzi non acquosi, capsule, capsule in gel, bustine, compresse o minicompresse. Addensanti, aromatizzanti, diluenti, emulsionanti, adiuvanti di dispersione o leganti possono essere desiderabili. Formulazioni orali preferite sono quelle in cui dsRNA descritti qui sono somministrati unitamente a uno o più potenziatori di penetrazione, tensioattivi e chelanti. Tensioattivi preferiti includono acidi grassi e/o loro esteri o sali, acidi biliari e/o loro sali. Acidi/sali biliari preferiti includono acido chenodeossicolico (CDCA) e acido urso-deossichenodeossicolico (UDCA) acido colico, acido deidrocolico, acido deossicolico, acido glucolico, acido glicolico, acido glico-deossicolico, acido taurocolico, acido taurodeossicolico, sodio tauro-24,25-diidro-fusidato e sodio glicodiidrofusidato. Acidi grassi preferiti includono acido arachidonico, acido undecanoico, acido oleico, acido laurico, acido caprilico, acido caprico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido linoleico, acido linolenico, dicaprato, tricaprato, monooleina, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloeptan-2-one, un'acilcarnitina, un'acil-colina, o un monogliceride, un digliceride o un suo sale farmaceuticamente accettabile (ad esempio, sodio). Sono anche preferite combinazioni di potenziatori di penetrazione, ad esempio, acidi/sali grassi in

M104.D1.SM.1DE

combinazione con acidi/sali biliari. Una combinazione particolarmente preferita è il sale sodico di acido laurico, acido caprico e UDCA. Ulteriori potenziatori di penetrazione includono poliossietilen-9-lauril etere, poliossietilen-20-cetil-etere. I dsRNA descritti qui possono essere somministrati oralmente in forma granulare incluse particelle liofilizzate o complessati per formare microparticelle o nanoparticelle. Agenti complessanti dsRNA includono poliamminoacidi; poliimmine; poliacrilati; polialchilacrilati, poliossetani, polialchilciano-acrilati; gelatine cationizzate, albumine, amidi, acrilati, polietilenglicoli (PEG) e amidi; polialchilcianoacrilati; poliimmine DEAE-derivatizzate, pollulani, cellulose e amidi. Agenti complessanti particolarmente preferiti includono chitosano, N-trimetilchitosano, poli-L-lisina, poliistidina, poliornitina, polispermine, protamina, polivinilpiridina, politiodietilamminometiletilene P(TDAE), poli-amminostirene (ad esempio, p-ammino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isoesilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-esilacrilato, DEAE-acrilammide, DEAE-albumina e DEAE-destrano, polimetilacrilato, poliesilacrilato, acido poli(D,L-lattico), acido poli(DL-lattico-co-glicolico (PLGA)), alginato e polietilenglicole (PEG). Formulazioni orali per dsRNA e loro preparazione sono descritte in dettaglio nella domanda U.S. Seriale n. 08/886.829 (depositata il 1 luglio 1997), Seriale n. 09/108.673 (depositata il 1 luglio 1998), Seriale n. 09/256.515 (depositata il 23 febbraio 1999),

M104.D1.SM.1DE

Seriale n. 09/082.624 (depositata il 21 maggio 1998) e Seriale n. 09/315.298 (depositata il 20 maggio 1999).

Composizioni e formulazioni per la somministrazione parenterale, intratecale o intraventricolare possono includere soluzioni acquose sterili che possono anche contenere tamponi, diluenti e altri additivi adeguati, quali, senza limitazione, potenziatori di penetrazione, composti veicolo e altri veicoli o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

Composizioni farmaceutiche includono, senza limitazione, soluzioni, emulsioni, e formulazioni contenenti liposomi. Queste composizioni possono essere generate da una varietà di componenti che includono, senza limitazione, liquidi preformati, solidi auto-emulsionanti e semisolidi autoemulsionanti.

Le formulazioni farmaceutiche che possono adeguatamente essere presentate in una forma di dosaggio unitario, possono essere preparate secondo le tecniche convenzionali ben note nell'industria farmaceutica. Tali tecniche includono la fase di associare i principi attivi con il veicolo(i) o l'eccipiente(i) farmaceutici. In generale, le formulazioni sono preparate associando uniformemente e intimamente i principi attivi con veicoli liquidi o veicoli solidi finemente divisi o entrambi, e quindi, se necessario, sagomare il prodotto.

Le composizioni possono essere formulate in una qualsiasi di molte possibili forme di dosaggio quali senza limitazione, compresse, capsule, capsule in gel, sciroppi liquidi, gel morbidi, supposte, ed enemi. Le composizioni descritte qui possono essere formulate anche

M104.D1.SM.1DE

come sospensioni in mezzi acquosi, non acquosi o misti. Sospensioni acquose possono inoltre contenere sostanze che aumentano la viscosità della sospensione inclusi, ad esempio, sodio carbossimetilcellulosa, sorbitolo e/o destrano. La sospensione può anche contenere stabilizzanti.

In una forma di realizzazione le composizioni farmaceutiche possono essere formulate e usate come schiume. Le schiume farmaceutiche includono formulazioni quali, senza limitazione, emulsioni, microemulsioni, creme, e gelatine e liposomi. Sebbene principalmente simili in termini di natura queste formulazioni variano in termini dei componenti e della consistenza del prodotto finale. La preparazione di tali composizioni e formulazioni è generalmente nota agli esperti nelle tecniche farmaceutiche e di formulazione e può essere applicata alla formulazione delle composizioni descritte qui.

La fraseologia e la terminologia usate qui sono a scopi descrittivi e non dovrebbero essere considerate limitative. L'uso di "includente", "comprendente" o "avente", "contenente", "implicante" e loro variazioni, intende comprendere gli elementi elencati successivamente e i loro equivalenti nonché elementi aggiuntivi.

ESEMPI

I seguenti esempi sono offerti per illustrare senza limitare l'invenzione rivendicata.

Come usato negli esempi forniti qui, il termine "ApoE" si riferisce a ApoE3 salvo diversamente identificato.

M104.D1.SM.1DE

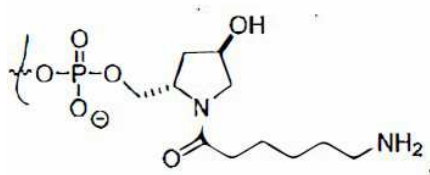
Esempio 1: Duplex di siRNA per bersagliamento di Luc e FVII

La Tabella 8 che segue fornisce sequenze esemplificative per bersagliamento di Luc e FVII.

Tabella 8.

Duplex	Senso/Antisenso	Sequenza 5'-3'	Target
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUA CdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTs dT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT	FVII

Osservazione: L8 è



il minuscolo è il nucleotide 2'-O-metil modificato, * sono i legami dello scheletro fosforotioato, fN è un 2'-fluoro nucleotide, dN è 2'-deossi nucleotide.

Esempio 2: Valutazione *in vivo* di FVII usando liposomi derivati da lipide cationico

Esperimenti di silenziamento del fattore VII e ApoB su roditori *in vivo*. Topi C57BL/6 (Charles River Labs, MA) e ratti Sprague-Dawley (Charles River Labs, MA) hanno ricevuto o soluzione salina o siRNA in formulazioni desiderate tramite iniezione nella vena caudale ad un volume di 0,01 mL/g. In vari punti temporali post-somministrazione, gli animali sono stati anestetizzati mediante inalazione di isofluorano e il sangue è stato prelevato in provette di separazione

M104.D1.SM.1DE

serica mediante prelievo retro orbitale. I livelli serici della proteina del fattore VII sono stati determinati in campioni usando un saggio cromogenico (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, OH o Biophen FVII, Aniara Corporation, OH) secondo i protocolli del produttore. Si è generata una curva standard usando il siero raccolto da animali trattati con soluzione salina. Negli esperimenti in cui i livelli di mRNA epatici sono stati valutati, in vari punti temporali post-somministrazione, gli animali sono stati sacrificati e i fegati sono stati raccolti e congelati rapidamente in azoto liquido. Il tessuto epatico congelato è stato macinato in polvere. Lisati tissutali sono stati preparati e i livelli di mRNA epatici del Fattore VII e di *apoB* sono stati determinati usando un saggio di DNA ramificato (QuantiGene Assay, Panomics, CA).

Esempio 3. Formulazioni liposomiali per bersagliamento di FVII

Il Fattore VII (FVII), una proteina prominente nella cascata di coagulazione, è sintetizzato nel fegato (epatociti) e secreto nel plasma. I livelli di FVII nel plasma possono essere determinati mediante un semplice saggio colorimetrico basato su piastra. Pertanto, FVII rappresenta un modello conveniente per determinare la modulazione negativa mediata da sirna di proteine derivate dai e patociti, nonché per monitorare concentrazioni plasmatiche e la distribuzione tissutale di particelle acido nucleico-lipide e siRNA.

Abbattimento del Fattore VII nei topi

L'attività di FVII è stata valutata in animali trattati con FVII siRNA 24 ore post-iniezione endovenosa (bolo) in topi C57BL/6. FVII è

M104.D1.SM.1DE

stato misurato usando un kit disponibile in commercio per determinare i livelli proteici nel siero o nel tessuto seguendo le istruzioni del fabbricante in una scala in micropiastra. La riduzione di FVII è stata determinata rispetto a topi di controllo non trattati e i risultati sono stati espressi come % di FVII residuo. Quattro livelli di dose (2, 5, 12,5, 25 mg/kg FVII siRNA) sono stati usati nello screening iniziale di ogni nuova composizione liposomiale, e questo dosaggio è stato espanso in studi successivi basati sui risultati ottenuti nello screening iniziale.

Determinazione della tollerabilità

La tollerabilità di ogni nuova formulazione di siRNA liposomiale è valutata mediante monitoraggio della variazione ponderale, osservazioni nell'ambiente della gabbia, chimica clinica e, in alcuni casi, ematologia. I pesi degli animali sono stati registrati prima del trattamento e 24 ore post-trattamento. I dati sono stati registrati come % di variazione del peso corporeo. Oltre alle misurazioni del peso corporeo, si è ottenuto un gruppo di chimica clinica completa, comprendente i marker della funzione epatica ad ogni livello di dose (2, 5, 12,5 e 25 mg/kg di siRNA) 24 ore post-iniezione usando una aliquota del siero raccolto per l'analisi di FVII. I campioni sono stati inviati al Central Laboratory for Veterinarians (Langley, BC) per le analisi. In alcuni casi, ulteriori topi sono stati inclusi nel gruppo di trattamento per consentire il prelievo di sangue intero per l'analisi ematologica.

Determinazione dell'indice terapeutico

M104.D1.SM.1DE

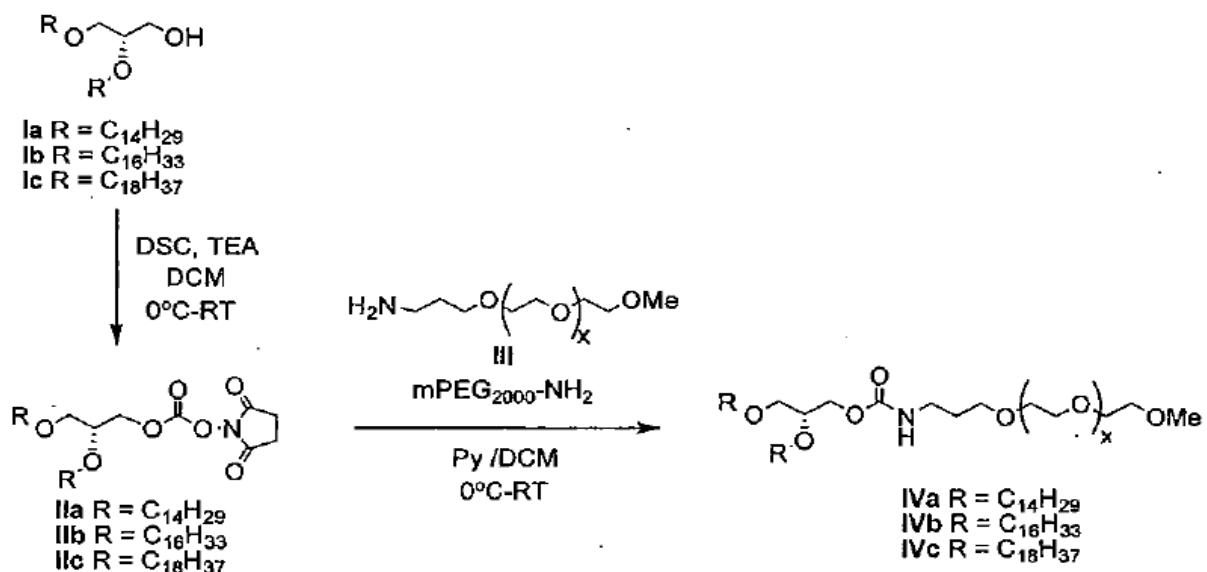
L'indice terapeutico (TI) è un parametro arbitrario generato confrontando le misure di tossicità e attività. Per questi studi, TI è stato determinato come:

$$TI = MTD \text{ (dose massima tollerata)} / ED_{50} \text{ (dose per il 50\% di abbattimento di FVII)}$$

L'MTD per questi studi è stata impostata come dose minima che causa >7% di diminuzione del peso corporeo e un aumento di >200 volte della alanina amminotransferasi (ALT), un marker chimico clinico con buona specificità per il danno epatico nei roditori. La ED_{50} è stata determinata dalle curve dose-attività di FVII.

siRNA di AD 1661 come fornito nell'Esempio 1 è stato somministrato in formulazioni comprendenti il seguente rapporto molare di DLin-M-C3-DMA:DSPC:Chol:PEG-DMG, che sono state preparate e testate nei metodi come descritto nell'Esempio 2: 60:7,5:31:1,5; 50:10:38:0,5:1,5; e 40:20:38,5:1,5. I risultati di questi esperimenti in vivo sono forniti in FIG. 1, che dimostra la capacità di silenziamento delle formulazioni come testato.

Esempio 4. Preparazione di 1,2-Di-O-alkil-sn3-carbomoilgliceride (PEG-DMG)



M104.D1.SM.1DE

Preparazione di IVa

1,2-Di-*O*-tetradecil-*sn*-gliceride **Ia** (30 g, 61,80 mmol) e *N,N'*-succinimidilcarbonato (DSC, 23,76 g, 1,5 eq) sono stati prelevati in diclorometano (DCM, 500 mL) e agitati su una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (TEA, 25,30 mL, 3 eq) è stata addizionata alla soluzione agitata e successivamente la miscela di reazione è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato monitorato mediante TLC. La miscela di reazione è stata diluita con DCM (400 mL) e lo strato organico è stato lavato con acqua (2X500 mL), soluzione di NaHCO₃ acquosa (500 mL) seguita da work-up standard. Il residuo ottenuto è stato essiccato a temperatura ambiente sotto alto vuoto per una notte. Dopo l'essiccazione, il carbonato grezzo **Ia** così ottenuto è stato dissolto in diclorometano (500 mL) e agitato su un bagno di ghiaccio. Alla soluzione agitata sono stati addizionati sotto argon mPEG₂₀₀₀-NH₂ (**III**, 103,00 g, 47,20 mmol, acquistata da NOF Corporation, Giappone) e piridina anidra (Py, 80 mL, eccesso). La miscela di reazione è stata quindi lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. I solventi e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto e il residuo è stato dissolto in DCM (200 mL) e caricato su una colonna di gel di silice impaccata in etil acetato. La colonna è stata inizialmente eluita con etil acetato e successivamente con gradiente di 5-10% metanolo in diclorometano fornendo il PEG-lipide IVa come sostanza solida bianca (105,30g, 83%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,20-5,12 (m, 1H), 4,18-4,01 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,70-3,20

M104.D1.SM.1DE

(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,10-2,01 (m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H),
1,56-1,45 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 48H), 0,84 (t, J=6,5Hz, 6H).

Intervallo MS trovato: 2660-2836.

Preparazione di IVb

1,2-Di-O-esadecil-sn-gliceride **Ib** (1,00 g, 1,848 mmol) e DSC (0,710 g, 1,5 eq) sono stati prelevati insieme in diclorometano (20 mL) e raffreddati a 0°C in una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (1,00 mL, 3 eq) è stata addizionata e la reazione è stata agitata per una notte. La reazione è stata eseguita mediante TLC diluita con DCM, lavata con acqua (2 volte), soluzione di NaHCO₃ e anidrificata su solfato di sodio. I solventi sono stati rimossi sotto pressione ridotta e il residuo risultante di **Ib** è stato mantenuto sotto alto vuoto per una notte. Questo composto è stato direttamente usato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50g, 0,687 mmol, acquistato dalla NOF Corporation, Giappone) e **Ib** (0,702 g, 1,5 eq) sono stati dissolti in diclorometano (20 mL) sotto argon. La reazione è stata raffreddata a 0°C. Piridina (1 mL, eccesso) è stata addizionata e la reazione è stata agitata per una notte. La reazione è stata monitorata mediante TLC. I solventi e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia (dapprima etil acetato seguito da 5-10% MeOH/DCM come eluizione a gradiente) per ottenere il composto richiesto **IVb** come sostanza solida (1,46 g, 76%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,17 (t, J=5,5Hz, 1H), 4,13 (dd, J=4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,05 (dd, J=5,00Hz,

M104.D1.SM.1DE

11,00 Hz, 1H), 3,82-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,05-1,90 (m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45 (m, 6H), 1,35-1,17 (m, 56H), 0,85 (t, J= 6,5Hz, 6H). Intervallo MS trovato: 2716-2892.

Preparazione di IVc

1,2-Di-O-ottadecil-*sn*-gliceride **Ic** (4,00 g, 6,70 mmol) e DSC (2,58 g, 1,5 eq) sono stati prelevati insieme in diclorometano (60 mL) e raffreddati a 0°C in una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (2,75 mL, 3 eq) è stata addizionata e la reazione è stata agitata per una notte. La reazione è stata eseguita mediante TLC, diluita con DCM, lavata con acqua (2 volte), soluzione di NaHCO₃ e anidrificata su solfato di sodio. I solventi sono stati rimossi sotto pressione ridotta e il residuo è stato mantenuto sotto alto vuoto per una notte. Questo composto è stato direttamente usato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50 g, 0,687 mmol, acquistato da NOF, Giappone) e **Iic** (0,760 g, 1,5 eq) sono stati dissolti in diclorometano (20 mL) sotto argon. La reazione è stata raffreddata a 0°C. Piridina (1 mL, eccesso) è stata addizionata e la reazione è stata agitata per una notte. La reazione è stata monitorata mediante TLC. I solventi e le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia (etil acetato seguito da 5-10% MeOH/DCM come eluizione a gradiente) per ottenere il composto desiderato **IVc** come sostanza solida bianca (0,92 g, 48%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,22-5,15 (m, 1H), 4,16 (dd, J=4,00 Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06 (dd, J=5,00 Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-

M104.D1.SM.1DE

O-, PEG-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 64H), 0,85 (t, J=6,5Hz, 6H). Intervallo MS trovato: 2774-2948.

Esempio 5: Preparazione di DLin-M-C3-DMA (cioè, (6Z,9Z,28Z,31Z)-eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilammino)butanoato)

Una soluzione di cloridrato di acido 4-N,N-dimetilamminobutirrico (0,51 g), (6Z,9Z,28Z,31Z)-eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), e cloridrato di 4-N,N-dimetilamminopiridina (0,61 g) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide (0,53 g) in diclorometano (5 mL) è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La soluzione è stata lavata con acido cloridrico diluito e successivamente con bicarbonato di sodio acquoso diluito. Le frazioni organiche sono state anidrificate su solfato di magnesio anidro, filtrate, e il solvente rimosso su un rotovap. Il residuo è stato fatto passare lungo una colonna di gel di silice (20 g) usando un gradiente di eluizione metanolo/diclorometano 1-5%. Le frazioni contenenti il prodotto purificato sono state combinate e il solvente rimosso fornendo un olio incolore (0,54 g).

I composti descritti qui possono essere sintetizzati mediante le procedure descritte nei seguenti documenti:

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

pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors. Tetrahedron (2002), 58(36), 7345-7354.

Esempio 6. Efficacia dei liposomi MC3 aventi varie composizioni liposomiali nei ratti.

Per esaminare la risposta alle dosi di MC3 contenute in formulazioni liposomiali nei ratti, si sono preparate le seguenti formulazioni liposomiali sostanzialmente come descritto nell'Esempio 2. Come fornito nella Tabella che segue, le componenti incluse sono indicate come segue: MC3-DSPC-colesterolo-PEG-C14. La Tabella 9 che segue fornisce formulazioni esemplificative come testato.

Animali	Sprague-Dawley						
Totale	27						
Vol. In.	Iniezione 5 µl/g						
(µl)							
Gruppo	Dimensione di gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (uL/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	3				5		PBS
2	3	FVII	1661	0.06	5	0.30	50-10-38.5-1.5
3	3	FVII	1661	0.02	5	0.10	50-10-38.5-1.5
4	3	FVII	1661	0.006	5	0.03	50-10-38.5-1.5
5	3	FVII	1661	0.002	5	0.01	50-10-38.5-1.5
6	3	FVII	1661	0.06	5	0.30	40-15-40-5
7	3	FVII	1661	0.02	5	0.10	40-15-40-5
8	3	FVII	1661	0.006	5	0.03	40-15-40-5
9	3	FVII	1661	0.002	5	0.01	40-15-40-5

Come mostrato in FIG. 2, la formulazione liposomiale avente il 50% in mole di MC3 ha mostrato una curva dose-riposta con efficacia a concentrazioni di siRNA leggermente inferiori rispetto a quella della formulazione liposomiale avente il 40% in mole di MC3.

M104.D1.SM.1DE

Esempio 7: Efficacia di liposomi MC3 mostra una dipendenza da ApoE nei topi.

Per esaminare ulteriormente il ruolo di ApoE nell'efficacia di varie formulazioni liposomiali, a topi di tipo selvatico e topi knockout per ApoE sono stati somministrati liposomi MC3 contenenti la composizione di siRNA AD-1661 a 0,1, 0,03 e 0,01 mg/kg sostanzialmente come descritto nell'Esempio 2. Metà delle formulazioni liposomiali sono state premiscelate con la proteina ApoE ricombinante al fine di determinare se l'aggiunta esogena di ApoE può superare l'assenza della proteina nei topi.

La Tabella 10 che segue mostra le formulazioni esemplificative come testato.

Tabella 10

Piano sperimentale							
Animali C57BL/6 e knockout per ApoE							
Totale 42							
Vol. In							
(μL) variabile in base al peso							
Gruppo	Dimensione di gruppo	Tipo topo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	3	C57BL/6				0.00	PBS
2	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0100	0.100	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
3	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0030	0.030	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
4	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
5	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0100	0.100	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE
6	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0030	0.030	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE
7	3	C57BL/6	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE
8	3	ApoE knockout				0.00	PBS
9	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0100	0.100	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
10	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0030	0.030	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
11	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 con ApoE
12	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0100	0.100	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE
13	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0030	0.030	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE
14	3	ApoE knockout	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 senza ApoE

La FIG. 3 mostra l'attenuazione dose-dipendente dei livelli di proteina FVII in topi di tipo selvatico (colonna destra) ma non in topi knockout ApoE deficienti (colonna sinistra) quando ricevevano i liposomi MC3-formulati, suggerendo un ruolo di ApoE nell'assorbimento cellulare e/o nel rilascio nel fegato. I liposomi MC3 formulati come sopra descritto con siRNA 1661 sono stati somministrati a concentrazioni di 0,1, 0,03 e 0,01 mg/kg da soli o premiscelati con la lipoproteina ApoE. A dosi molto superiori (ad es., ~1,0 mg/kg o superiore), tuttavia le formulazioni MC3-formulate sono risultate mediare il silenziamento dell'mRNA di FVII e della proteina (non mostrata). Come mostrato nella FIG. 3, le formulazioni liposomiali MC3 formulate testate non sono in grado di mediare il silenziamento di FVII in topi knockout per ApoE, salvo premiscelati con ApoE ricombinante.

M104.D1.SM.1DE

Pertanto, l'attività potrebbe essere recuperata in topi knockout per ApoE premiscelando MC3 (un liposoma contenente MC3) con ApoE.

Esempio 8: Efficacia di formulazioni liposomiali contenenti MC3 che variano in termini di percentuale in moli e lunghezza della coda di fosfocoline.

Per esaminare l'effetto di variazioni sulla percentuale in moli e la lunghezza della coda di fosfocoline sull'efficacia di varie formulazioni liposomiali, si sono testate varie formulazioni comprendenti DSPC, DMPC e DLPC per l'efficacia del silenziamento di FVII a 0,01 o 0,03 mg/kg.

La Tabella 11 che segue mostra le formulazioni esemplificative come testate:

Piano sperimentale

Animali	C57BL/6
Totale	45
Vol. In.	
(μ L)	variabile in base al peso

Gruppo	Dimensione Gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	3				0.00	PBS
2	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DSPC
3	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DSPC
4	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DMPC
5	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DMPC
6	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DLPC
7	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50-10-38.5-1.5 1661 DLPC
8	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DSPC
9	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DSPC
10	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DMPC
11	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DMPC
12	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DLPC
13	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40-20-38.5-1.5 1661 DLPC
14	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 30-30-38.5-1.5 1661 DMPC
15	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 30-30-38.5-1.5 1661 DMPC

M104.D1.SM.1DE

La FIG. 4 mostra gli effetti di variazioni della percentuale in mole dell'MC3, ad es., confrontando 50 e 40 per cento in mole e per il caso della formulazione contenente DMPC, 50, 40 e 30 per cento in mole. La FIG. 4 mostra anche l'effetto di variazioni nel lipide neutro, che mostra i diversi risultati per le formulazioni liposomiali MC3 comprendenti DSPC, DMPC e DLPC.

Esempio 9: Incorporazione dei lipidi GalNAc in formulazioni liposomiali.

Per analizzare i meccanismi di rilascio alternativi potenziali, si sono eseguiti esperimenti in vivo usando formulazioni liposomiali comprendenti lipidi coniugati N-acetil galattosammina (GalNAc). GalNAc è stato selezionato come possibile ligando di bersagliamento in quanto è noto che il recettore di GalNAc è considerato essere altamente espresso nel fegato. Studi sono stati pertanto realizzati in topi e ratti per testare l'efficacia di formulazioni liposomiali contenenti MC3 comprendenti inoltre il lipide GalNAc3-PEG-DSG di Formula III sostanzialmente come descritto nell'Esempio 2. In tutti gli esperimenti, la quantità totale dei lipidi PEG-coniugati è stata mantenuta costante (ad es., laddove 0,5% in mole di GalNAc3-PEG è addizionato, la quantità corrispondente di PEG-DSG è stata ridotta dello 0,5% in mole). Si sono usati quattro animali per ognuno dei nove gruppi per genotipo nell'esperimento.

La Tabella 12 che segue fornisce dettagli sperimentali per i metodi inclusi liposomi contenenti MC3 aventi concentrazione del lipide PEG del 5% in cui le formulazioni sono state testate in topi C57BL6. I liposomi comprendenti le seguenti quantità molari relative:

M104.D1.SM.1DE

50/10/35/5 di MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG. Quando 0,5% di GalNAc3-PEG è addizionato, la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 4,5%.

Tabella 12

Piano sperimentale							
Animali C57BL6							
Totale 36							
Vol. In.							
(μL) variabile in base al peso							
Gruppo	Dimensione gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (μL/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0.1	10	1.00	50/10/35/5
3	4	FVII	1661	0.05	10	0.50	50/10/35/5
4	4	FVII	1661	0.025	10	0.25	50/10/35/5
5	4	FVII	1661	0.0125	10	0.125	50/10/35/5
6	4	FVII	1661	0.1	10	1.00	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
7	4	FVII	1661	0.05	10	0.50	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
8	4	FVII	1661	0.025	10	0.25	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
9	4	FVII	1661	0.0125	10	0.125	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide

La Tabella 13 che segue fornisce dettagli sperimentali per i metodi inclusi liposomi contenenti MC3 aventi il 10% in mole di concentrazione del lipide PEG-DSG, in cui le formulazioni sono state testate in topi C57BL6. I liposomi comprendevano le seguenti quantità molari relative: 50/10/30/10 di MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG. Quando 0,5% di GalNAc3-PEG è addizionato, la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 9,5%.

Tabella 13

Piano sperimentale							
Animali C57BL6							
Totale 36							
Vol. In.							
(μL) Variabile in base al peso							

Gruppo	Dimensione di gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (uL/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0.5	10	5.00	50/10/30/10
3	4	FVII	1661	0.25	10	2.50	50/10/30/10
4	4	FVII	1661	0.125	10	1.25	50/10/30/10
5	4	FVII	1661	0.0625	10	0.625	50/10/30/10
6	4	FVII	1661	0.5	10	5	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
7	4	FVII	1661	0.25	10	2.50	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc
8	4	FVII	1661	0.125	10	1.25	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc
9	4	FVII	1661	0.0625	10	0.63	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc

La FIG. 5 mostra gli effetti in cui all'aumentare della schermatura PEG diminuisce il silenziamento non-GalNAc mediato nei topi C57BL6. Ciò è dimostrato dalle concentrazioni di PEG sia del 5% sia del 10% in topi C57BL6. L'inclusione di C18-PEG (ossia, PEGDSG) a 10% in mole inibisce efficacemente il silenziamento che può essere superato mediante sostituzione dello 0,5% in mole del lipide PEG con una quantità equimolare di lipide GalNAc (ossia GalNAc3-PEG-DSG di Formula III). Pertanto, aumentando la schermatura di PEG (ad es., da 5% in mole a 10% in mole), sembra diminuire il silenziamento non-GalNAc mediato ma anche la potenza complessiva.

Esperimenti simili sono anche stati eseguiti nei ratti in cui il lipide PEG (anche PEG-DSG) è stato incluso nei liposomi sia al 5% in mole sia al 10% in mole. La Tabella 14 che segue fornisce dettagli sperimentali per i metodi comprendenti liposomi contenenti MC3 aventi una concentrazione lipidica di PEG del 5%, quelle formulazioni sono

M104.D1.SM.1DE

state testate nei ratti. I liposomi comprendenti le seguenti quantità molari relative: 50/10/35/5 di MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG. Quando 0,5% GalNAc3-PEG è addizionato la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 4,5%.

Tabella 14

Piano sperimentale							
Animali Ratti Sprague-Dawley							
Totale 36							
In. Vol.							
(µL) Iniezione in bolo							
Gruppo	Dimensione gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (uL/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	0.2	5	1.00	50/10/35/5
3	4	FVII	1661	0.1	5	0.50	50/10/35/5
4	4	FVII	1661	0.05	5	0.25	50/10/35/5
5	4	FVII	1661	0.025	5	0.125	50/10/35/5
6	4	FVII	1661	0.2	5	1.00	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
7	4	FVII	1661	0.1	5	0.50	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
8	4	FVII	1661	0.05	5	0.25	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
9	4	FVII	1661	0.025	5	0.125	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide

La Tabella 15 che segue fornisce i dettagli sperimentali per i metodi inclusi liposomi contenenti MC3 aventi una concentrazione del lipide PEG del 10%, in cui le formulazioni sono state testate nei ratti. I liposomi comprendenti le seguenti relative quantità molari: 50/10/30/10 di MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG. Quando 0,5% GalNAc3-PEG è addizionato, la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 9,5%.

Tabella 15

Piano sperimentale							
Animali Sprague-Dawley							
Totale 36							
Vol. In.							
(μL) Iniezione in bolo							
Gruppo	Dimensione di gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (uL/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	1	5	5.00	50/10/30/10
3	4	FVII	1661	0.5	5	2.50	50/10/30/10
4	4	FVII	1661	0.25	5	1.25	50/10/30/10
5	4	FVII	1661	0.125	5	0.625	50/10/30/10
6	4	FVII	1661	1	5	5.00	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
7	4	FVII	1661	0.5	5	2.50	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
8	4	FVII	1661	0.25	5	1.25	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
9	4	FVII	1661	0.125	5	0.625	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide

La FIG. 6 mostra i risultati di formulazioni MC3 contenenti C18 PEG a 5% in mole e 10% in mole, somministrate a ratti ai dosaggi indicati. Le formulazioni contenenti il 10% in mole di PEG-DSG mostrano scarso silenziamento alle concentrazioni testate (0,625 - 5 mg/kg) nei ratti. Tuttavia, l'inclusione di 0,5% in mole di GalNAc3-PEG-DSG di Formula III (ossia, la sostituzione di 0,5% in mole del C18-PEG), ripristina l'abbattimento di FVII. Pertanto, rispetto ai topi, nei ratti, la formulazione altamente schermata mantiene generalmente meglio la potenza rispetto alle differenze mostrate tra le concentrazioni di 5% e 10% in mole di PEG.

Esempio 10: Valutazione delle variazioni della percentuale in mole di componenti in formulazioni liposomiali contenenti MC3 con e senza inclusione di 0,5% in mole di GalNAc3-PEG-DSG.

Al fine di determinare l'efficacia di liposomi contenenti MC3

M104.D1.SM.1DE

aventi diverse percentuali in mole di componenti con e senza GalNAc3-PEG-DSG, si sono preparate le seguenti formulazioni liposomiali e sono state testate in topi C57BL6 sostanzialmente come descritto nell'Esempio 2 che precede. I componenti come illustrato nella tabella, sono forniti nell'ordine che segue: MC3/DSPC/Chol./PEG-DSG. Quando lo 0,5% di GalNAc3-PEG è addizionato, la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 4,5%, come mostrato nella Tabella 16 che segue.

Tabella 16

Animali C57BL6 Totale 33 Vol. In. (μ L) Variabile in base al peso							
Gruppo	Dimensione di gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (μ L/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	3				10		PBS
2	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	50/10/35/5
3	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	50/10/35/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
4	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	40/15/40/5
5	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	40/15/40/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
6	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	30/25/40/5
7	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	30/25/40/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide
8	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	20/35/40/5
9	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	20/35/40/4.5 con 0.5% GalNAc-lipide

Come mostrato nella FIG. 7, l'addizione del GalNAc alle formulazioni liposomiali migliora il silenziamento di FVII in ogni formulazione, ossia, in cui l'MC3 è presente a 50, 40 e 30% in mole.

Esempio 11: Efficacia di liposomi contenenti MC3 e GalNAc in topi WT e ASGPR KO.

Per esaminare il ruolo di ASGPR nell'efficacia di varie formulazioni liposomiali, topi di tipo selvatico e knockout per ASGPR

M104.D1.SM.1DE

hanno ricevuto liposomi MC3 contenenti la composizione AD-1661 siRNA a 3, 1 e 0,3 mg/kg come descritto nell'Esempio 1. I componenti come mostrati nella Tabella sono forniti nell'ordine che segue: MC3/DSPC/Chol./PEG-DSG. Quando 0,5% di GalNAc3-PEG è addizionato, la corrispondente quantità di PEG-DSG è ridotta al 9,5% come mostrato nella Tabella 17 che segue.

Tabella 17

Piano sperimentale Animali C57BL6 e ASGPr KO Totale 25+15 Vol. In. (μ L) Variabile in base al peso							
Gruppo	Dimensione di gruppo	Target	siRNA	Conc. (mg/mL)	Vol. in. (μ L/g)	Dose (mg/kg)	Veicolo
1	5				10		PBS
2	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50/10/30/10
3	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
4	5	FVII	1661	0.1	10	1.00	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
5	5	FVII	1661	0.03	10	0.300	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide
6	5				10		PBS
7	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50/10/30/10
8	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50/10/30/9.5 con 0.5% GalNAc-lipide

La FIG. 8 mostra i risultati di questi esperimenti, dimostrando che il ripristino nell'abbattimento di FVII in formulazioni contenenti C18 PEG mediante inclusione del lipide GalNAc3-PEG-DSG è abolito quando somministrato in un ceppo murino deficiente in termini di recettore dell'asialoglicoproteina (ASGPR), che è il recettore atteso per la frazione caratteristica di bersagliamento di GalNAc.

Esempio 12: Sintesi oligonucleotidica**Sintesi**

Tutti gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati su un

M104.D1.SM.1DE

sintetizzatore AKTAoligopilot. Supporti solidi in vetro con pori controllati disponibili in commercio (dT-CPG, 500', Prime Synthesis) e RNA fosforamiditi con gruppi di protezione standard, 5'-O-dimetossitritil N6-benzoil-2'-t-butildimetilsilil-adenosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidite, 5'-O-dimetossitritil-N4-acetil-2'-t-butildimetilsilil-citidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidite, 5'-O-dimetossitritil-N2--isobutil-2'-t-butildimetilsilil-guanosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidite, e 5'-O-dimetossitritil-2'-t-butildimetilsilil-uridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidite (Pierce Nucleic Acids Technologies) sono stati usati per la sintesi oligonucleotidica. Le 2'-F fosforamiditi, 5'-O-dimetossitritil-N4-acetil-2'-fluro-citidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidite e 5'-O-dimetossitritil-2'-fluoro-uridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidite sono state acquistate da (Promega). Tutte le fosforamiditi sono usate ad una concentrazione di 0,2M in acetonitrile (CH₃CN) eccetto per la guanosina che è usata ad una concentrazione di 0,2M in 10% di FHT/ANC (v/v). Si è usato un tempo di accoppiamento/ricircolo di 16 minuti. L'attivatore è 5-etil tiotetrazolo (0,75M, American International Chemicals); per l'ossidazione di PO sono usati iodio/acqua/piridina e per l'ossidazione di PS è utilizzato PADS (2%) in 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

Filamenti coniugati con il ligando in 3' sono sintetizzati usando il supporto solido contenente il ligando corrispondente. Ad esempio, l'introduzione dell'unità colesterolo nella sequenza è eseguita da una idrossiprolinol-colesterol fosforamidite. Il

M104.D1.SM.1DE

colesterolo è attaccato al *trans*-4-idrossiprolinolo attraverso un legame 6-amminoesanoato per ottenere una frazione caratteristica idrossiprolinolo-colesterolo. I siRNA marcati con Cu-3 e Cy-5,5 (fluoroforo) sull'estremità 5' sono sintetizzati dalla fosforamidite Quasar-570 (Cy-3) corrispondente e sono acquistati dalla Biosearch Technologie. La coniugazione di ligandi all'estremità 5' e/o la posizione interna è ottenuta usando un sintone ligando-fosforamidite adeguatamente protetto. Un accoppiamento per 15 minuti prolungato di soluzione allo 0,1 M di fosforamidite in CH₃CN anidro in presenza dell'attivatore 5-(etiltilio)-1*H*-tetrazolo su un oligonucleotide legato sul supporto solido. L'ossidazione del fosfite internucleotidico sul fosfato è realizzato usando iodio-acqua standard come riportato (1) o mediante trattamento con *terz*-butil idroperossido/acetone/acqua (10:87:3) con un oligonucleotide coniugato con un tempo di attesa di ossidazione di 10 min. Il fosforotioato è introdotto mediante ossidazione del fosfito sul fosforotioato usando un reagente di trasferimento di zolfo quale DDTT (acquistato da AM Chemicals), reagenti PADS e/o Beaucage. La colesterolo fosforamidite è sintetizzata internamente e usata ad una concentrazione di 0,1 M in diclorometano. Il tempo di accoppiamento per la colesterolo fosforamidite è di 16 minuti.

Deprotezione I (Deprotezione di nucleobasi)

Dopo completamento della sintesi, il supporto è trasferito a un flacone di vetro da 100 mL (VWR). L'oligonucleotide è scisso dal supporto con deprotezione simultanea della base e dei gruppi fosfato

M104.D1.SM.1DE

con 80 mL di una miscela di ammoniaca etanolica [ammoniaca: etanolo (3:1)] per 6,5 ore a 55°C. Il flacone è raffreddato brevemente su ghiaccio e quindi la miscela di ammoniaca etanolica è filtrata in un flacone nuovo da 250 mL. Il GPC è lavato con 2 porzioni per 40 mL di etanolo/acqua (1:1 v/v). Il volume della miscela è quindi ridotto a ~30 mL mediante roto-vap. La miscela è quindi congelata su ghiaccio secco e essiccata sotto vuoto su un speed vac.

Deprotezione II (Rimozione del gruppo 2'-TBDMS)

Il residuo secco è risospeso in 26 mL di trietilammina, trietilammina triidrofluoruro (TEA•3HF) o piridina-HF e DMSO (3:4:6) e riscaldata a 60°C per 90 minuti per rimuovere i gruppi *terz*-butildimetilsilil (TBDMS) nella posizione 2'. La reazione è quindi spenta con 50 mL di acetato di sodio 20 mM e il pH è regolato a 6,5. L'oligonucleotide è conservato in un congelatore sino a purificazione.

Analisi

Gli oligonucleotidi sono analizzati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) prima della purificazione e la selezione del tampone e colonna dipende dalla natura della sequenza e/o dal ligando coniugato.

Purificazione HPLC

Oligonucleotidi ligando-coniugati sono purificati mediante HPLC preparative in fase inversa. Gli oligonucleotidi non coniugati sono purificati mediante HPLC a scambio anionico su una colonna di gel TSK impaccata internamente. I tamponi sono sodio fosfato 20 mM (pH 8,5)

M104.D1.SM.1DE

in CH₃CN 10% (tampone A) e sodio fosfato 20 mM (pH 8,5) in 10% CH₃CN, 1M NaBr (tampone B). Le frazioni contenenti gli oligonucleotidi a lunghezza completa sono riunite, desalate e liofilizzate. Circa 0,15 OD di oligonucleotidi desalati sono diluiti in acqua a 150 µL e quindi pipettati in fiale speciali per analisi CGE e LC/MS. I composti sono quindi analizzati mediante LC-ESMS e CGE.

Preparazione di siRNA

Per la preparazione di siRNA, le quantità equimolari di filamento senso e antisense sono riscaldate in 1xPBS a 95°C per 5 min e lentamente raffreddate a temperatura ambiente. L'integrità del duplex è confermata mediante analisi HPLC.

Tabella 18. Duplex di siRNA per il targeting di Luc e FVII

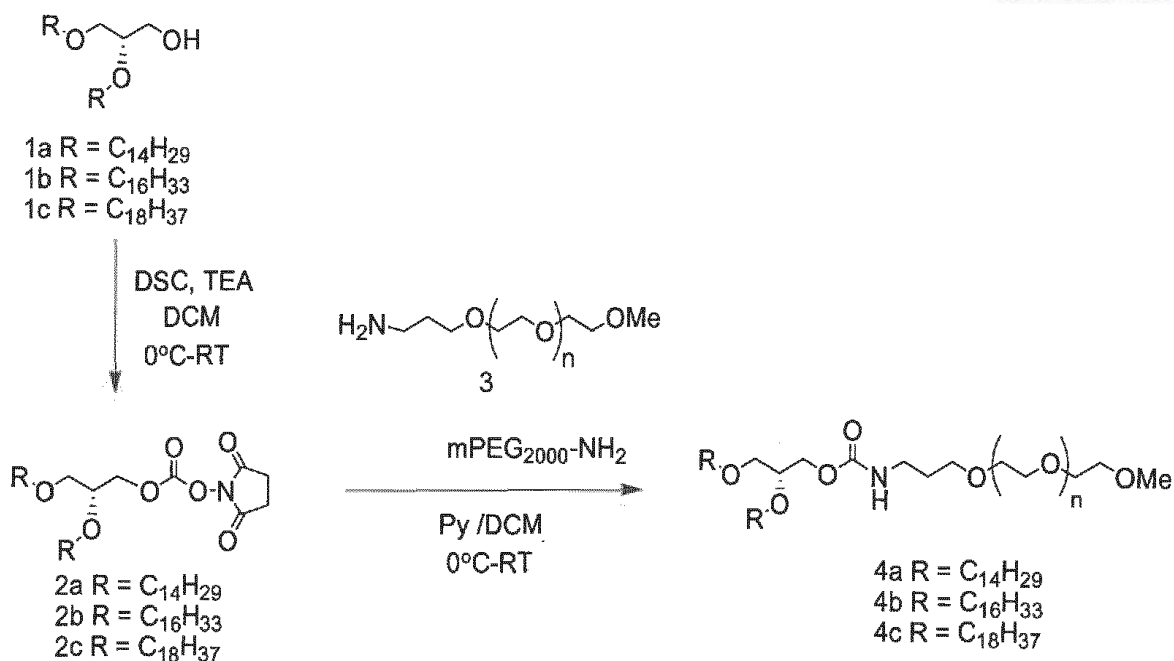
Duplex	Seq. ID	Sequenza 5'-3'	Target
I000/1001	1	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT	Luc
	2	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	
AD-1955	3	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	Luc
	4	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	
AD-1596	5	GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT	FVII
	6	GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	
AD-1661	7	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT	FVII
	8	GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT	

In corsivo la modificazione è 2'OMe e Nf è una nucleobase 2'F modificata, dT è deossitimidina, s è fosfotioato.

Esempio 13: Sintesi di mPEG2000-1,2-Di-O-alcil-sn3-carbomoil-gliceride

I lipidi PEG quali mPEG2000-1,2-Di-O-alcil-sn3-carbomoilgliceride sono stati sintetizzati usando le seguenti procedure:

M104.D1.SM.1DE



mPEG2000-1,2-Di-O-alkyl-sn3-carbomoylglyceride

Preparazione del composto 4a (PEG-DMG): 1,2-Di-O-tetradecil-sn-gliceride **1a** (30 g, 61.80 mmol) e *N,N'*-succinimidilcarbonato (DSC, 23,76 g, 1,5eq) sono stati prelevati in diclorometano (DCM, 500 mL) e agitati su una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (25,30 mL, 3eq) è stata addizionata alla soluzione agitata e successivamente la miscela di reazione è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente. Il progredire della reazione è stato monitorato mediante TLC. La miscela di reazione è stata diluita con DCM (400 mL) e lo strato organico è stato lavato con acqua (2X500 mL), soluzione di NaHCO₃ acquosa (500 mL) seguita da work-up standard. Il residuo ottenuto è stato anidrificato a temperatura ambiente sotto alto vuoto per una notte. Dopo l'essiccazione, il carbonato grezzo **2a** pertanto ottenuto è stato dissolto in diclorometano (500 mL) e agitato su un bagno di ghiaccio. Alla soluzione agitata mPEG2000-NH₂ (3, 103,00 g, 47,20 mmol, acquistato dalla NOF Corporation, Giappone)

M104.D1.SM.1DE

e piridina anidra (80 mL, eccesso) sono stati addizionati sotto argon. In alcune forme di realizzazione, la metossi-(PEG)*x*-ammina ha una *x*= da 45 a 49, preferibilmente da 47 a 49, e più preferibilmente 49. La miscela di reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte. I solventi e le sostanze volatili sono stati rimossi sotto vuoto e il residuo è stato dissolto in DCM (200 mL) e caricato su una colonna di gel di silice impaccata in etil acetato. La colonna è stata inizialmente eluita con etil acetato e successivamente con gradiente di 5-10% metanolo in diclorometano per fornire il lipide PEG desiderato **4a** come sostanza solida bianca (105,30g, 83%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,20-5,12 (m, 1H), 4,18-4,01 (m, 2H), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,10-2,01 (m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 48H), 0,84 (t, J= 6,5Hz, 6H). Intervallo MS trovato: 2660-2836.

Preparazione di 4b: 1,2-Di-*O*-esadecil-*sn*-gliceride **1b** (1,00 g, 1,848 mmol) e DSC (0,710 g, 1,5eq) sono stati presi insieme in diclorometano (20 mL) e raffreddati a 0°C in una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (1,00 mL, 3eq) è stata addizionata ad essa e agitata per una notte. La reazione è stata seguita mediante TLC, diluita con DCM, lavata con acqua (2 volte), soluzione di NaHCO₃ ed essiccata su solfato di sodio. I solventi sono stati rimossi sotto pressione ridotta e il residuo **2b** sotto alto vuoto per una notte. Questo composto è stato direttamente usato per la successiva reazione senza ulteriore purificazione. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **3** (1,50g, 0,687 mmol, acquistato dalla NOF Corporation, Giappone) e il composto della fase

M104.D1.SM.1DE

precedente **2b** (0,702g, 1,5eq) sono stati dissolti in diclorometano (20 mL) sotto argon. La reazione è stata raffreddata a 0°C. Piridina (1 mL, eccesso) è stata addizionata ad essa e agitata per una notte. La reazione è stata monitorata mediante TLC. I solventi e le sostanze volatili sono stati rimossi sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia (dapprima etil acetato e quindi 5-10% MeOH/DCM come eluizione a gradiente) per ottenere il composto richiesto **4b** come sostanza solida bianca (1,46 g, 76 %). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,17 (t, J= 5,5Hz, 1H), 4,13 (dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,05 (dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,05-1,90 (m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45 (m, 6H), 1,35-1,17 (m, 56H), 0,85 (t, J= 6,5Hz, 6H). Intervallo MS trovato: 2716-2892.

Preparazione di 4c: 1,2-Di-O-ottadecil-sn-gliceride **1c** (4,00 g, 6,70 mmol) e DSC (2,58 g, 1,5eq) sono stati presi insieme in diclorometano (60 mL) e raffreddati a 0°C in una miscela di acqua ghiacciata. Trietilammina (2,75 mL, 3eq) è stata addizionata ad essa e agitata per una notte. La reazione è stata seguita mediante TLC, diluita con DCM, lavata con acqua (2 volte), soluzione di NaHCO₃ ed essiccata su solfato di sodio. I solventi sono stati rimossi sotto pressione ridotta e il residuo sotto alto vuoto per una notte. Questo composto è stato direttamente usato per la reazione successiva senza ulteriore purificazione. MPEG₂₀₀₀-NH₂ **3** (1,50g, 0,687 mmol, acquistato dalla NOF Corporation, Giappone) e il composto della fase precedente **2c** (0,760g, 1,5eq) sono stati dissolti in diclorometano (20 mL) sotto

M104.D1.SM.1DE

argon. La reazione è stata raffreddata a 0°C. Piridina (1 mL, eccesso) è stata addizionata ad essa e agitata per una notte. La reazione è stata monitorata mediante TLC. I solventi e le sostanze volatili sono stati rimossi sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia (dapprima etil acetato successivamente 5-10% MeOH/DCM come eluizione a gradiente) per ottenere il composto **4c** richiesto come sostanza solida bianca (0,92 g, 48%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,22-5,15 (m, 1H), 4,16 (dd, J=4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06 (dd, J=5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75 (m, 2H), 3,70-3,20 (m, -O-CH₂-CH₂-O, PEG-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48 (m, 4H), 1,31-1,15 (m, 64H), 0,85 (t, J=6,5Hz, 6H). Intervallo MS trovato: 2774-2948.

Esempio 14: Protocollo generale per il metodo di estrusione

I lipidi (lipide cationico di formula I, DSPC, colesterolo, DMG-PEG) sono solubilizzati e miscelati in etanolo secondo il rapporto molare desiderato. I liposomi sono formati mediante un metodo di iniezione di etanolo in cui lipidi miscelati sono addizionati al tampone acetato di sodio a pH 5,2. Questo determina una formazione spontanea di liposomi nel 35% di etanolo. I liposomi sono estrusi attraverso una membrana in policarbonato da 0,08 μm almeno 2 volte. Una soluzione di siRNA stock è stata preparata in acetato di sodio e 35% di etanolo ed è stata addizionata al liposoma per un carico. La soluzione di siRNA-liposoma è stata incubata a 37°C per 30 min e successivamente diluita. L'etanolo è stato rimosso e sostituito in tampone PBS mediante dialisi o filtrazione a flusso tangenziale.

Esempio 15: Protocollo generale per il metodo di miscelazione in linea

Soluzioni stock singole e separate sono preparate, una contenente lipide e l'altra siRNA. La soluzione stock contenente lipide cationico di formula I, DSPC, colesterolo e lipide PEG è preparata mediante solubilizzazione in 90% di etanolo. Il restante 10% è tampone citrato a pH ridotto. La concentrazione dello stock lipidico è di 4 mg/mL. Il pH di questo tampone citrato può variare tra pH 3-5 a seconda del tipo di lipide fusogenico impiegato. L'siRNA è anche solubilizzato in tampone citrato ad una concentrazione di 4 mg/mL. Per scala ridotta, 5 mL di ogni soluzione stock sono preparati.

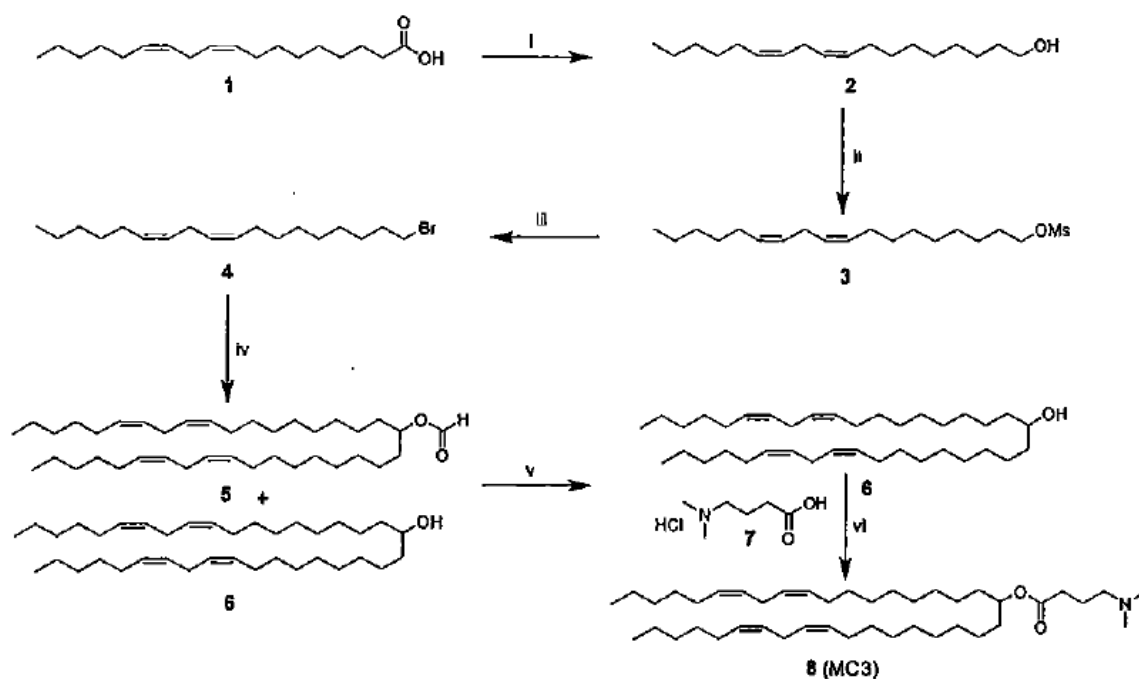
Le soluzioni stock sono completamente limpide e i lipidi devono essere completamente solubilizzati prima della combinazione con siRNA. Pertanto, le soluzioni stock possono essere riscaldate per solubilizzare completamente i lipidi. Gli siRNA usati nel processo possono essere oligonucleotidi non modificati o modificati e possono essere coniugati con frazioni caratteristiche lipofile quali colesterolo.

I singoli stock sono combinati pompando ogni soluzione ad una giunzione a T. Una pompa di Watson-Marlow a doppia testa è usata per controllare contemporaneamente l'avvio e l'arresto dei due flussi. Un tubo in polipropilene da 1,6 mm è ulteriormente ridotto in un tubo da 0,8 mm al fine di aumentare la portata lineare. La linea in polipropilene (ID = 0,8 mm) è attaccata ad un lato di una giunzione a T. La T in polipropilene ha un bordo lineare di 1,6 mm per un volume risultante di 4,1 mm³. Ognuna delle estremità grandi (1,6 mm) della linea di polipropilene è collocata in provette di test contenenti o

M104.D1.SM.1DE

lo stock lipidico solubilizzato o siRNA solubilizzato. Dopo la giunzione a T, un singolo tubo è collocato in cui fuoriuscirà il flusso combinato. Il tubo si estende quindi in un contenitore con un volume 2x di PBS. Il PBS viene agitato rapidamente. La portata per la pompa è ad una impostazione di 300 giri/min o 110 mL/min. L'etanolo è rimosso e sostituito a PBS mediante dialisi. Le formulazioni lipidiche sono quindi concentrate usando centrifugazione o diafiltrazione ad una concentrazione di lavoro adeguata.

Esempio 16: Sintesi di [6Z,9Z,28Z,31Z]-eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilammino)butanoato] (un lipide cationico di formula I o MC3)



i) Vtride/THF ; ii) $\text{MsCl}, \text{Et}_3\text{N}, \text{DMAP}/\text{DCM}$; iii) LiBr/DMF ; iv) Mg, HCOOEt ; v) $\text{NaOH}, \text{THF}, \text{Acqua}$; vi) $\text{EDCI}, \text{DMAP}, \text{DIPEA}$

Preparazione dell'alcol 2

Un reattore tutto di vetro da 200L asciutto e pulito dotato di una entrata per l'argon e un termopozzetto è stato caricato con 60 L di THF e 5,73 Kg (20,4 mol) di acido linoleico. Il contenuto del

M104.D1.SM.1DE

reattore è stato raffreddato al di sotto di 0°C usando un bagno di acetone-ghiaccio secco. A questa soluzione fredda, 13,8 L di Vitride (60% in peso/vol) in toluene è stato addizionato lentamente mantenendo la temperatura interna della miscela di reazione al di sotto di 0°C. (Osservazione: l'addizione iniziale di vitride era esotermica e si è osservata formazione di schiuma. La formazione di schiuma è cessata dopo 15 minuti di addizione). L'addizione di vitride è durata 3 ore e 45 minuti. Al completamento dell'addizione, la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. Un'aliquota è stata prelevata e spenta con Na₂SO₄ sat e il prodotto grezzo così ottenuto è stato analizzato mediante TLC per la presenza dell'acido di partenza. La TLC ha mostrato completamento della reazione e la miscela di reazione è stata nuovamente raffreddata al di sotto di 0°C in circa 45 minuti. Una soluzione satura di solfato di sodio (preparato dissolvendo 1,1 Kg di solfato di sodio in 1,5 L di acqua) è stata lentamente addizionata alla miscela di reazione in 45 min. Al completamento dell'addizione, 25 L di etil acetato sono stati addizionati a un periodo di 30 min con agitazione. La miscela di reazione ottenuta è stata filtrata attraverso un letto di celite in un periodo di 45 min e il letto di celite è stato lavato con ulteriori 17 L di etil acetato per rimuovere tutto il prodotto dal residuo. Le sostanze organiche combinate sono state concentrate sotto pressione ridotta. Il residuo è stato dissolto in 15 L di etil acetato e lo strato organico è stato lavato con acqua (2 X 7 L) ed essiccato su solfato di sodio (1,1 Kg). Dopo filtrazione, lo strato

M104.D1.SM.1DE

organico è stato concentrato sotto pressione ridotta ed essiccato sotto alto vuoto per ottenere il prodotto linoleil alcol come olio. Resa grezza = 5,5 kg (resa teorica = 5,43 Kg). Questo prodotto è stato usato senza ulteriore purificazione in una fase successiva.

Processo per la preparazione di linoleil mesilato 3

Un reattore tutto di vetro da 200 L asciutto e pulito, dotato di un ingresso per l'argon e termopozzetto, è stato caricato con 45 L di DCM e 5,5 Kg del prodotto grezzo della fase 1. A questa soluzione 11,5 L di trietilammina sono stati addizionati seguiti da 0,252 Kg (2,0 mol) di DMAP. La soluzione è stata raffreddata a -10°C usando una miscela di acetone-ghiaccio secco e a questa massa di reazione fredda è stata addizionata a gocce una soluzione di mesil cloruro (3,2 L, 41,3 mol) in DCM (10 L) in un periodo di 3 ore mantenendo al contempo una temperatura al di sotto di 0°C . Al completamento dell'addizione la miscela di reazione è stata agitata a 0°C per 1 ora dopo di che la TLC (5% EtOAc in DCM; colorazione PMA) della miscela di reazione ha mostrato una completa scomparsa dell'alcol di partenza. Alla miscela di reazione sono stati addizionati 17 L di ghiaccio-acqua ghiacciata e gli strati sono stati separati. Lo strato superiore acquoso è stato nuovamente lavato con 10 L di DCM e gli strati sono stati separati. Gli strati organici combinati sono stati lavati con 2x10 L di acido cloridrico diluito (preparato miscelando 2 L di HCl Con. con 18 L di acqua RO), 2 X 7,5 L di acqua e 10 L di soluzione salina (preparata dissolvendo 11 Kg di NaCl in 10 L di acqua RO). Lo strato organico è stato separato, anidrificato su Na_2SO_4

M104.D1.SM.1DE

(2,75 Kg) e filtrato. Lo strato organico è stato fatto evaporare sotto pressione ridotta ed essiccato sotto vuoto per ottenere il mesilato grezzo come olio giallo chiaro. Resa grezza = 7,1 Kg (resa teorica = 7,1 Kg). Questo materiale è stato usato senza ulteriore purificazione nella fase successiva. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ = 5,42-5,21 (m, 4H), 4,20 (t, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 2,19-2,00 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,06-1,18 (m, 18H), 0,88 (t, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ = 130,76, 130,54, 128,6, 128,4, 70,67, 37,9, 32,05, 30,12, 29,87, 29,85, 29,68, 29,65, 29,53, 27,72, 27,71, 26,15, 25,94, 23,09, 14,60. MS. Peso molecolare calcolato per $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}$, Cal. 344,53, Trovato 343,52 (M-H⁻).

Preparazione di linoleil bromuro 4

Un reattore tutto di vetro da 200 L asciutto e pulito, dotato di un ingresso per l'argon e termopozzetto, è stato caricato con 25 L di DMF e 7,1 Kg del prodotto grezzo della fase 2. Questa miscela è stata raffreddata a -10°C con miscela di acetone-ghiaccio secco. A questa miscela agitata si è addizionata una soluzione di bromuro di litio (2,7 Kg, 31,0 mol) in 25L di DMF in un periodo di 1,5 ore mantenendo al contempo la temperatura di reazione al di sotto di 0°C . Al completamento dell'addizione, la miscela di reazione è stata agitata a 45°C per 18-20 ore fino a quando la TLC (10% EtOAc in esani, colorazione PMA) di un'aliquota ha mostrato completa scomparsa del mesilato di partenza. La miscela di reazione è stata diluita con 70 L di acqua ed estratta con 57 L di esani. Lo strato acquoso è stato ulteriormente estratto con 2 X 10 L di esani e gli strati organici

M104.D1.SM.1DE

combinati (circa 120 L) sono stati nuovamente lavati con 2 X 10 L di acqua e 1 X 10 L di soluzione salina (preparata dissolvendo 14 Kg di cloruro di sodio in 10 L di acqua). Lo strato organico ottenuto (120 L) è stato anidrificato su solfato di sodio (4 Kg) e concentrato sotto pressione ridotta per ottenere il prodotto grezzo (6,5 Kg). Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna usando gel di silice da 60-120 mesh con l'uso di esani come eluente. La concentrazione del prodotto grezzo ha fornito 5,5 Kg (81%, tre fasi) del bromuro **4** come liquido incolore ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 5,41-5,29$ (m, 4H), 4,20 (d, 2H), 3,40 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2,77 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 2,09-2,02 (m, 4H), 1,88-1,00 (m, 2H), 1,46-1,27 (m, 18H), 0,88 (t, $J = 3,9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3) $\delta = 130,41, 130,25, 128,26, 128,12, 34,17, 33,05, 31,75, 29,82, 29,57, 29,54, 29,39, 28,95, 28,38, 27,42, 27,40, 25,84, 22,79, 14,28$.

Preparazione di dilinoleilmetanolo **6**

Un reattore tutto di vetro da 20 L asciutto e pulito, dotato di entrate di argon, condensatore di reflusso e termopozzetto, è stato degassificato e purificato con argon. Il reattore è stato caricato con 277 g (11,3 mol) di magnesio attivato seguito da 1,5 L di etere anidro. Il reattore è stato nuovamente degassato tre volte e spurgato con argon. Il bromuro **4** (2,5 Kg, 7,6 mol) è stato dissolto in 5 L di etere anidro sotto argon e 1 L di questa soluzione è stata addizionata al reattore seguita da 25 mL (0,35 mol) di dibromometano. Il contenuto del reattore è stato riscaldato a 40°C usando un bagno di acqua (si è osservata effervescenza seguita da riflusso indicante

M104.D1.SM.1DE

l'inizio della formazione del reagente di Grignard). Dopo l'inizio della reazione, si è rimosso il riscaldamento dal reattore e i restanti 4 L del bromuro sono stati lentamente addizionati in un periodo di 2 ore e 30 minuti mantenendo un lieve riflusso della miscela. Al completamento dell'addizione, la miscela di reazione è stata nuovamente riscaldata a riflusso (temperatura del bagno 45°C) per 1 ora dopo la quale una aliquota della miscela di reazione è stata spenta con acqua e analizzata mediante TLC (esani, colorazione PMA) che ha mostrato completo consumo del bromuro di partenza. La miscela di reazione è stata raffreddata al di sotto di 10°C usando un bagno di ghiaccio e una soluzione di etil formiato (275 mL in 4 L di etere) in etere è stata addizionata in un periodo di 2 ore e 30 min e dopo completamento dell'addizione la miscela di reazione è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per 1 ora. La miscela di reazione è stata raffreddata nuovamente a 10°C e acetone (1,15 L) è stato addizionato lentamente alla miscela seguita dall'addizione di 7 L di ghiaccio-acqua ghiacciata ed una soluzione di acido solforico al 10% (preparata diluendo 3,4 L di acido solforico con 34 L di ghiaccio-acqua ghiacciata). Il prodotto è stato estratto con 3 x 10 L di etere e gli strati organici combinati sono stati lavati con 10 L di soluzione salina e anidrificati su solfato di sodio (2 Kg). La concentrazione dello strato organico sotto pressione ridotta ha fornito il prodotto grezzo (2 Kg) come una miscela di dilinoleil alcol con richiesta unitamente a minori quantità di prodotto O-formiato. Questo prodotto grezzo è stato ridissolto in THF (4L) e

M104.D1.SM.1DE

caricato nel reattore tutto di vetro da 20L. A questo una soluzione di è NaOH (0,934 Kg dissolti in 8 L di ghiaccio-acqua ghiacciata) è stata addizionata e il contenuto è stato riscaldato a 65°C per 18 ore dopo le quali la TLC (10% etere in esani) ha mostrato completa conversione del prodotto O-formilato nel dilinoleilmetanolo richiesto. La miscela di reazione è stata raffreddata ed è stata estratta con etere (3 X 4 L) e gli strati organici combinati sono stati lavati con 5 L di soluzione salina e anidrificati su solfato di sodio (4 Kg). La filtrazione seguita dalla concentrazione dello strato organico ha fornito il prodotto grezzo. Il prodotto grezzo che si è ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna usando un gel di silice da 60-120 mesh usando il 4% di etere in esani. La concentrazione delle frazioni del prodotto puro ha fornito il prodotto puro 6 (1,45 Kg, 80%) come liquido incolore. NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,47-5,24 (m, 8H), 3,56 (dd, $J = 6,8, 4,2$, 1H), 2,85-2,66 (m, 4H), 2,12-1,91 (m, 9H), 1,50-1,17 (m, 46H), 0,98-0,76 (m, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 130,41, 130,37, 128,18, 128,15, 77,54, 77,22, 76,91, 72,25, 37,73, 31,75, 29,94, 29,89, 29,83, 29,73, 29,58, 29,53, 27,46, 27,43, 25,89, 25,86, 22,80, 14,30.

Preparazione di [6Z,9Z,28Z,31Z]-eptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilammino)butanoato] MC3 (8):

Il dinoleil metanolo 6 (144 g, 272 mmol) è stato dissolto in 1 L didiclorometano e ad esso è stato addizionato il sale cloridrato di acido di dimetilamminobutirrico 7 (55 g, 328 mmol) seguito da diisopropilettilammina (70 mL) e DMAP (4 g). Dopo agitazione per 5 min

M104.D1.SM.1DE

a temperatura ambiente, è stato addizionato EDCI (80 g, 417 mmol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte dopo la quale l'analisi THL (gel di silice, 5% MeOH in CH₂Cl₂) ha mostrato la completa scomparsa dell'alcol di partenza. La miscela di reazione è stata diluita con CH₂Cl₂ (500 mL) e lavata con NaHCO₃ saturo (400 mL), acqua (400 mL) e soluzione salina (500 mL). Gli strati organici combinati sono stati anidrificati su Na₂SO₄ e i solventi sono stati rimossi *in vacuo*. Il prodotto grezzo (180 g) così ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su colonna flash [2,5 Kg gel di silicio, usando i seguenti eluenti i) colonna impaccata con 6L di 0,1% NEt₃ in DCM; dopo carico ii) 4 L di 0,1% NEt₃ in DCM; iii) 16 di 2% MeOH - 98% di 0,1% NEt₃ in DCM; iv) 4L di 2,5% MeOH - 97,5% di 0,1% NEt₃ in DCM; v) 12L di 3% MeOH - 97% di 0,1% NEt₃ in DCM] per isolare il prodotto grezzo **8** (MC3, 159 g, 91%) come olio incolore. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5,46-5,23 (m, 8H), 4,93-4,77 (m, 1H), 2,83-2,66 (m, 4H), 2,37-2,22 (m, 4H), 2,20 (s, 6H), 2,10-1,96 (m, 9H), 1,85-1,69 (m, 2H), 1,49 (d, *J* = 5,4, 4H), 1,39-1,15 (m, 39H), 0,95-0,75 (m, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 173,56, 130,38, 130,33, 128,17, 128,14, 77,54, 77,22, 76,90, 74,44, 59,17, 45,64, 34,36, 32,69, 31,73, 29,87, 29,76, 29,74, 29,70, 29,56, 29,50, 27,44, 27,41, 25,84, 25,55, 23,38, 22,78, 14,27. EI-MS (+ve): MW calc. per C₄₃H₇₉NO₂ (M+ H)⁺: 642,6, trovato: 642,6.

Esempio 17. Formulazione di siRNA usando vescicole preformate

Le particelle contenenti lipidi cationici sono state realizzate usando il metodo delle vescicole preformate. Il lipide cationico

M104.D1.SM.1DE

DSPC, colesterolo e PEG-lipide sono stati solubilizzati in etanolo ad un rapporto molare di 40/10/40/10, rispettivamente. La miscela lipidica è stata addizionata ad un tampone acquoso (citrato 50mM, pH 4) miscelando ad una concentrazione di etanolo e lipide finale del 30% (vol/vol) e 6,1 mg/mL rispettivamente e lasciata raggiungere l'equilibrio a temperatura ambiente per 2 min prima dell'estrusione. I lipidi idratati sono stati estrusi attraverso due filtri con dimensione dei pori da 80 nm e impilati (Nuclepore) a 22°C usando Lipex Extruder (Northern Lipids, Vancouver, BC) fino a quando si è ottenuto un diametro della vescicola di 70-90 nm, come determinato dall'analisi Nicomp. Ciò ha richiesto normalmente 1-3 passaggi. Per alcune miscele di lipidi cationici che non formavano piccole vescicole l'idratazione della miscela lipidica con un tampone a pH inferiore (citrato 50mM, pH 3) per protonare il gruppo fosfato sul gruppo di testa di DSPC ha favorito la formazione di vescicole stabili da 70-90 nm.

siRNA di FVII (solubilizzato in una soluzione acquosa di citrato 50mM, pH 4 contenente il 30% di etanolo) è stato addizionato alle vescicole pre-equilibrate a 35°C, ad una velocità di circa 5mL/min con miscelazione. Dopo che si è ottenuto un rapporto siRNA/lipide di bersagliamento finale di 0,06 (peso/peso) la miscela è stata incubata per ulteriori 30 min a 35°C per lasciare riorganizzare le vescicole e per l'incapsulazione del siRNA di FVII. L'etanolo è stato quindi rimosso e il tampone esterno sostituito con PBS (NaCl 155mM, Na₂HPO₄ 3mM, KH₂PO₄ 1mM, pH 7,5) mediante dialisi o diafiltrazione a flusso

M104.D1.SM.1DE

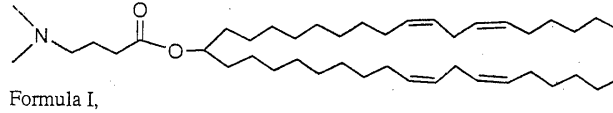
tangenziale. Il rapporto siRNA incapsulato/lipide è stato determinato dopo rimozione dell'siRNA non incapsulato usando colonne di centrifugazione ad esclusione sterica o colonne a centrifugazione a scambio ionico. La curva di dose-risposta che illustra la percentuale residua di FVII contro la dose (mg/kg) è illustrata in figura 9.

Esempio 18. Determinazione della pKa in un lipide cationico di formula I

La pKa del lipide cationico di formula I è stata determinata sostanzialmente come descritto in (Eastman et al 1992 Biochemistry 31:4262-4268) usando la sonda fluorescente acido 2-(p-toluidino)-6-naftalensolfonico (TNS), che non è fluorescente in acqua ma che diventa notevolmente fluorescente quando legato a membrane. Le vescicole costituite da lipide cationico/DSPC/CH/PEG-c-DOMG (rapporto molare 40:10:40:10) sono state diluite a 0,1mM in tamponi (130mM NaCl, 10mM CH₃COONH₄, 10mM MES, 10mM HEPES) di vari pH variando da 2 a 11. Un'aliquota della soluzione acquosa TNS (1 µM finale) è stata addizionata alle vescicole diluite e dopo 30 secondi di un periodo di equilibratura la parte fluorescente della soluzione contenente TNS è stata misurata a lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione di 321nm e 445nm, rispettivamente. La pKa delle vescicole contenenti lipide cationico è stata determinata tracciando la fluorescenza misurata rispetto al pH delle soluzioni e adattando i dati ad una curva sigmoidale usando il programma grafico commerciale IgorPro. La curva di titolazione di pKa per il lipide cationico di formula I è mostrata in figura 10.

RIVENDICAZIONI

1. Particella lipidica comprendente un lipide cationico di formula I:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

2. Particella lipidica della rivendicazione 1, in cui la particella lipidica comprende anche un lipide neutro ed un lipide in grado di ridurre l'aggregazione di particelle.

3. Particella lipidica secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, comprendente inoltre un agente terapeutico.

4. Particella lipidica secondo la rivendicazione 3, in cui l'agente terapeutico è un acido nucleico scelto dal gruppo che consiste di un plasmide, un oligonucleotide immunostimolatorio, un oligonucleotide a filamento singolo, un oligonucleotide a filamento doppio, un aptamero o un ribozima.

5. Particella lipidica secondo la rivendicazione 4, in cui l'agente terapeutico è un siRNA o in cui l'agente terapeutico è una sequenza di mRNA che codifica un polipeptide terapeuticamente utile.

6. Composizione farmaceutica comprendente la particella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 ed un eccipiente, veicolo o diluente farmaceuticamente accettabile.

7. Metodo *in vitro* per modulare l'espressione di un gene bersaglio in una cellula, il metodo comprendendo fornire a una cellula una particella lipidica secondo una qualsiasi delle

M104.D1.SM.1DE

rivendicazioni da 1 a 5 o una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6.

8. Particella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 o una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6 per uso in un metodo *in vivo* per modulare l'espressione di un gene bersaglio in una cellula.

9. Metodo secondo la rivendicazione 7, o la particella lipidica o composizione farmaceutica per uso secondo la rivendicazione 8, in cui il gene bersaglio è selezionato dal gruppo costituito da Fattore VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, gene PDGF beta, gene Erb-B, gene Src, gene CRK, gene GRB2, gene RAS, gene MEKK, gene JNK, gene RAF, gene Erk1/2, gene PCNA(p21), gene MYB, gene JUN, gene FOS, gene BCL-2, gene Cyclin D, gene VEGF, gene EGFR, gene Ciclina A, gene Ciclina E, gene WNT-1, gene beta-catenina, gene c-MET, gene PKC, gene NFkB, gene STAT3, gene della sopravvivenza, gene Her2/Neu, gene della topoisomerasi I, gene della topoisomerasi II alfa, gene p73, gene p21(WAF1/CIP1), gene p27(KIP1), gene PPM1D, gene caveolina I, gene MIB I, gene MTAI, gene M68, mutazioni in geni soppressori di tumore, gene soppressore di tumore p53 e loro combinazioni.

10. Particella lipidica secondo la rivendicazione 3 o la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6 per uso nel trattamento di una malattia o disturbo **caratterizzato da** sovraespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto una particella lipidica secondo la rivendicazione 3 o una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6, in cui

M104.D1.SM.1DE

l'agente terapeutico è selezionato da un siRNA, un microRNA, un oligonucleotide antisense e un plasmide in grado di esprimere un siRNA, un microRNA o un oligonucleotide antisense, e in cui il siRNA, microRNA o RNA antisense comprende un polinucleotide che si lega specificamente a un polinucleotide che codifica il polipeptide, o un loro complemento.

11. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6 per uso nel trattamento di una malattia o disturbo **caratterizzato da** sottoespressione di un polipeptide in un soggetto, comprendente fornire al soggetto la composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6, in cui l'agente terapeutico è un plasmide che codifica il polipeptide o una variante funzionale o un suo frammento.

12. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6 per uso in un metodo per indurre una risposta immunitaria in un soggetto, il metodo comprendendo fornire al soggetto una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 6, in cui l'agente terapeutico è un oligonucleotide immunostimolante.

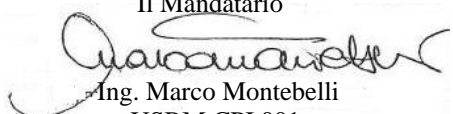
13. Vaccino comprendente la particella lipidica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 e un antigene associato a una malattia o patogeno.

14. Metodo per preparare una particella lipidica secondo la rivendicazione 4 o 5 comprendente le fasi di:

- (i) combinare una miscela di lipidi con una soluzione acquosa tamponata di acido nucleico per produrre una miscela intermedia contenente acido nucleico incapsulato in particelle lipidiche,

in cui gli acidi nucleici incapsulati sono presenti in un rapporto acido nucleico/lipidi da 3% in peso a 25% in peso; e
(ii) innalzare il pH per neutralizzare almeno una porzione delle cariche di superficie sulle particelle di lipide-acido nucleico.

Dogana, 6 dicembre 2021

In fede
Il Mandatario

Ing. Marco Montebelli
USBM CPI 001

DLin-M-C3-DMA: Valutazione delle diverse composizioni nel modello di FVII murino

Proteina FVII

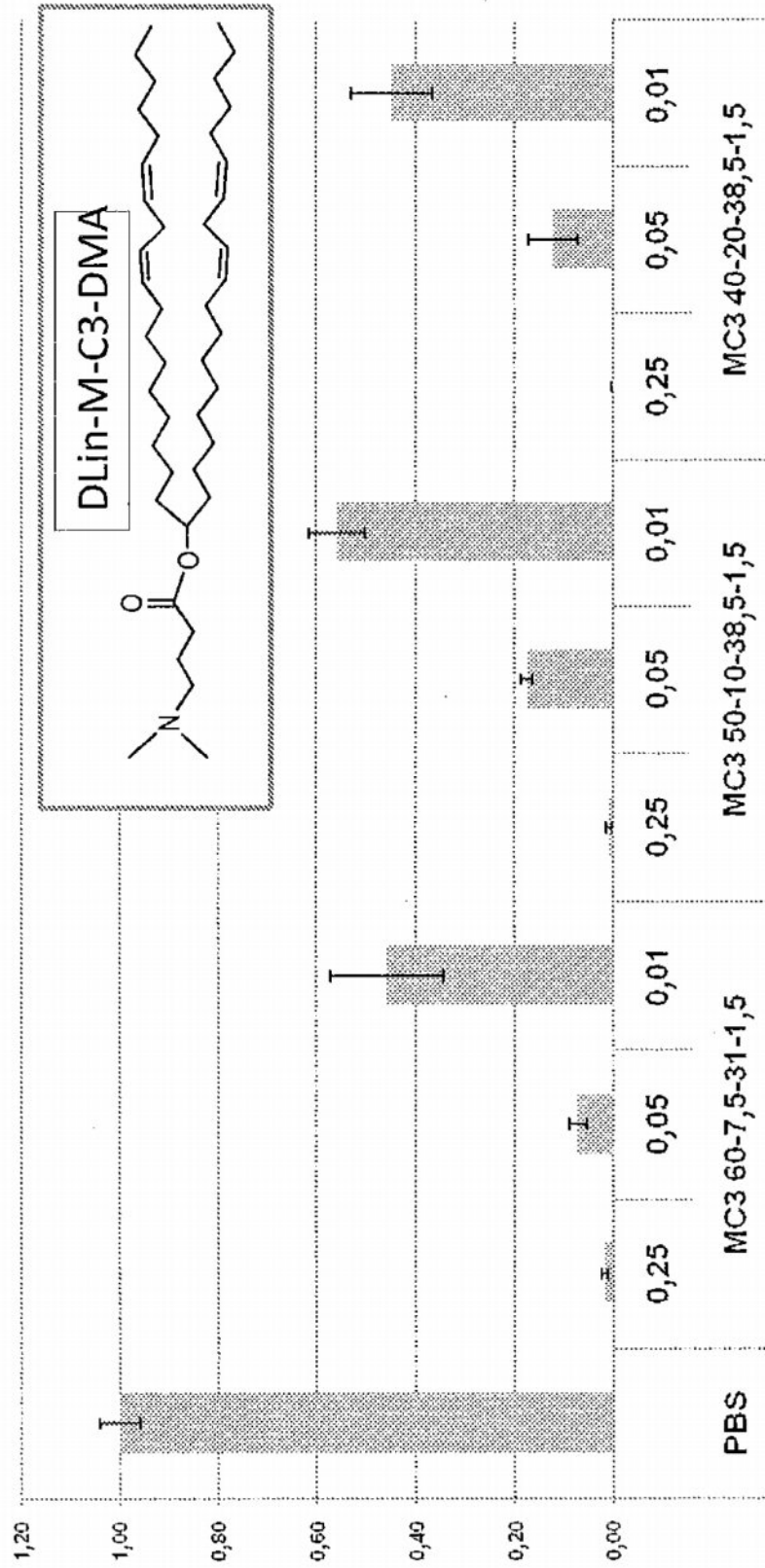


FIG 1

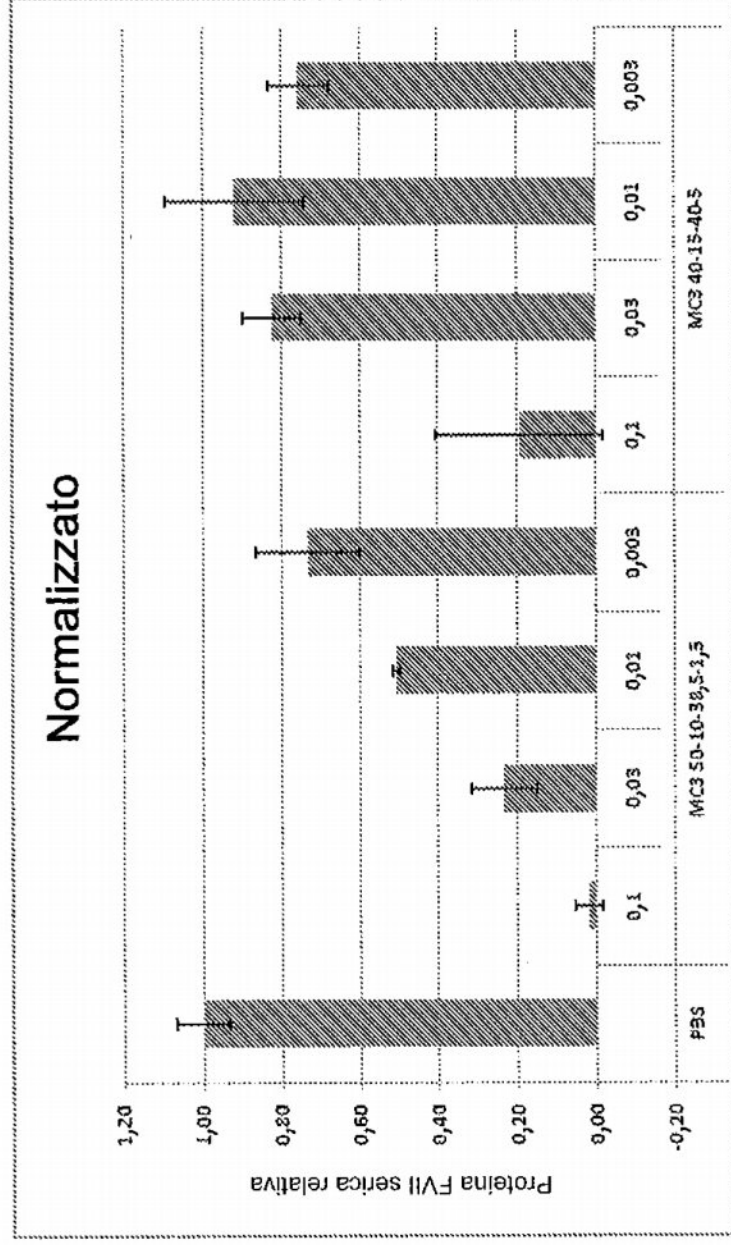


FIG. 2

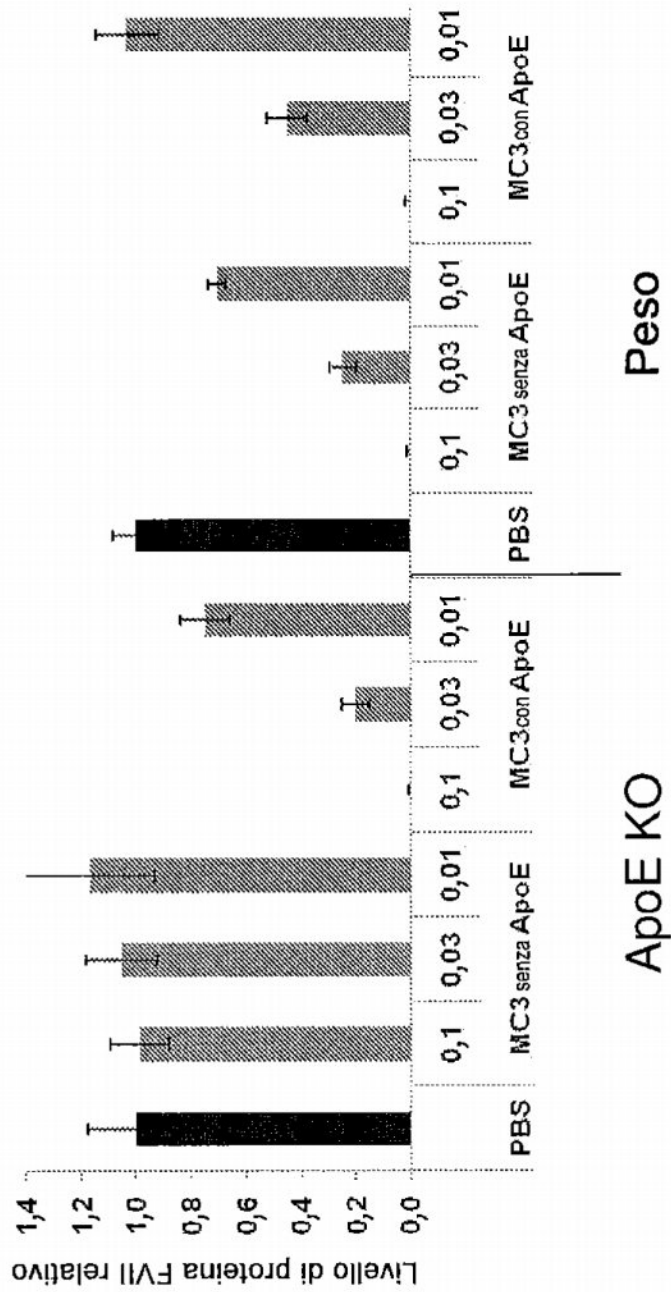


FIG. 3

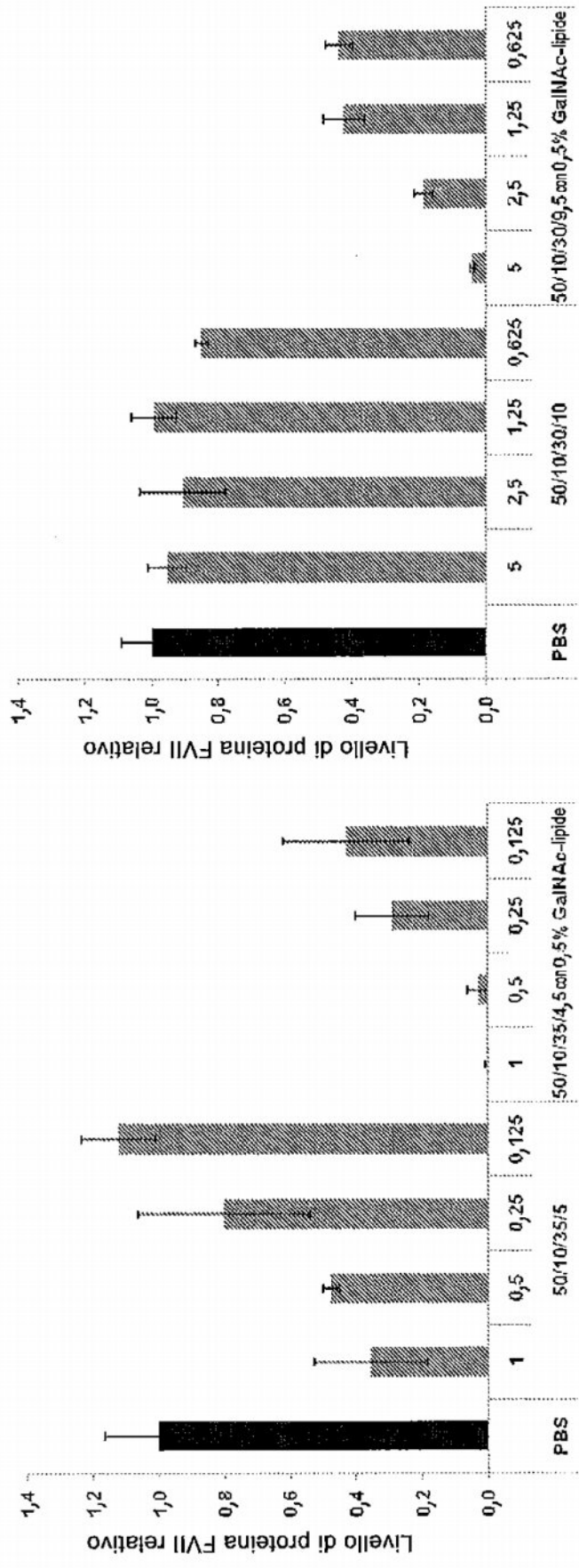


FIG. 5

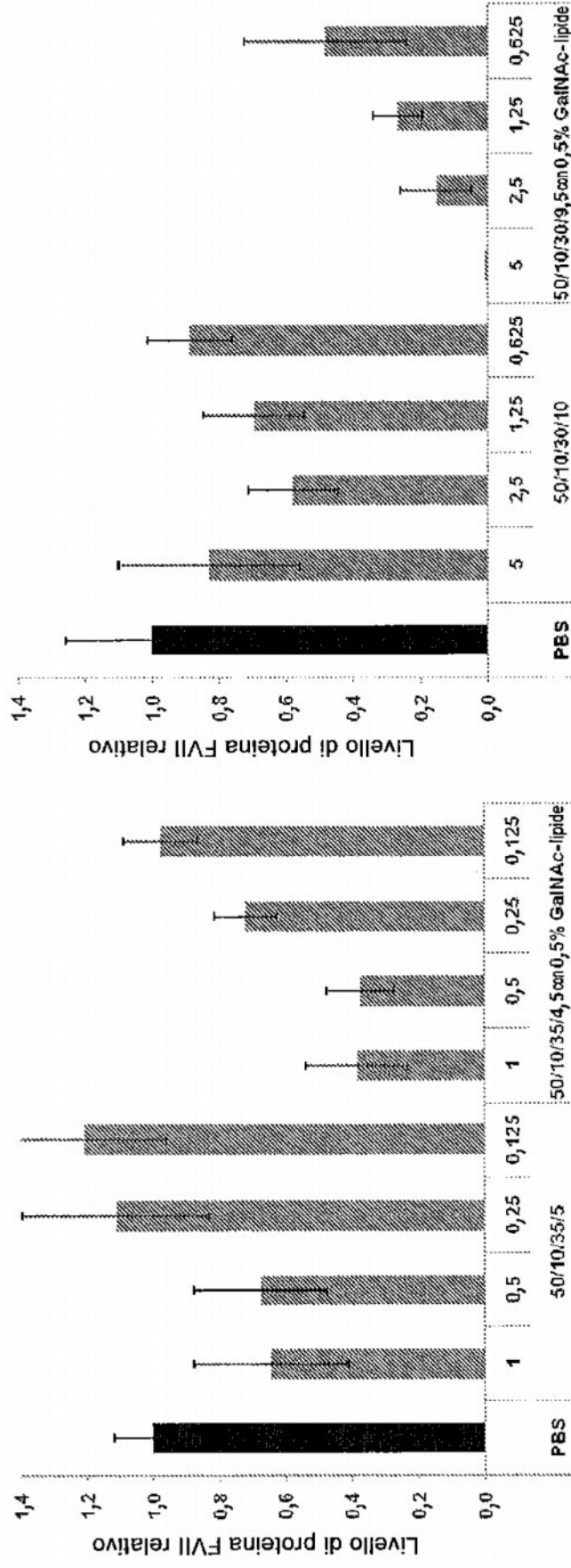


FIG. 6

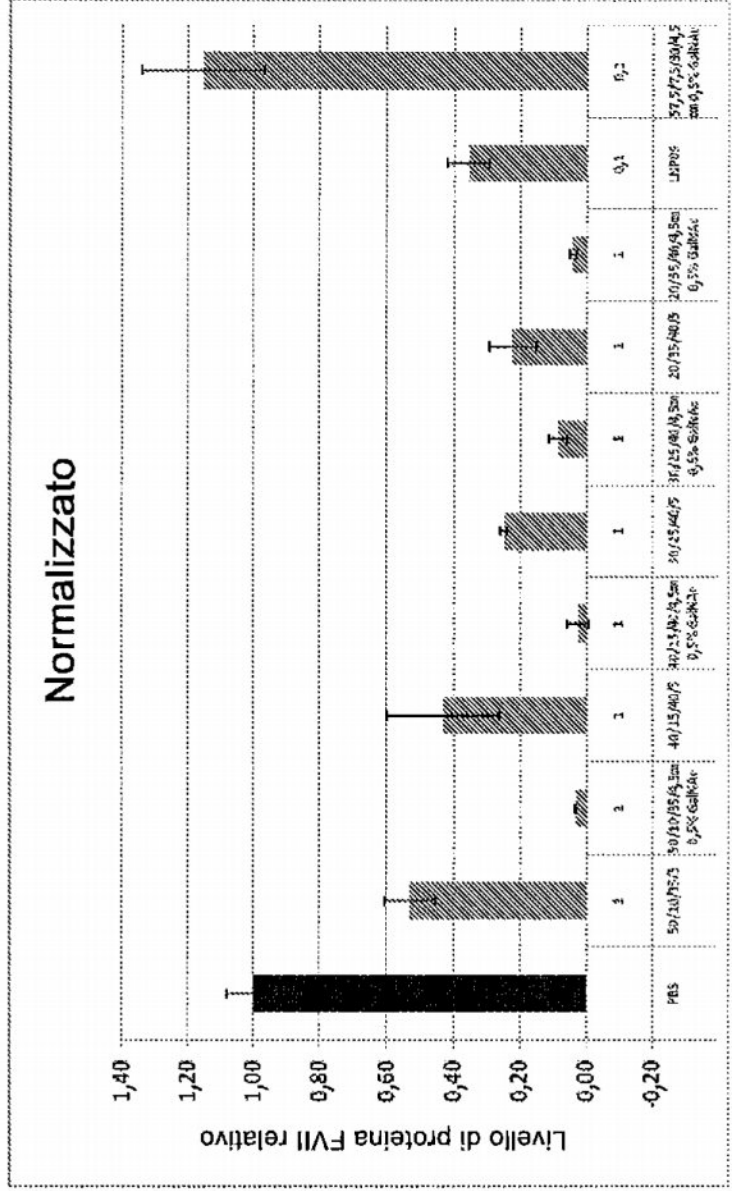


FIG. 7

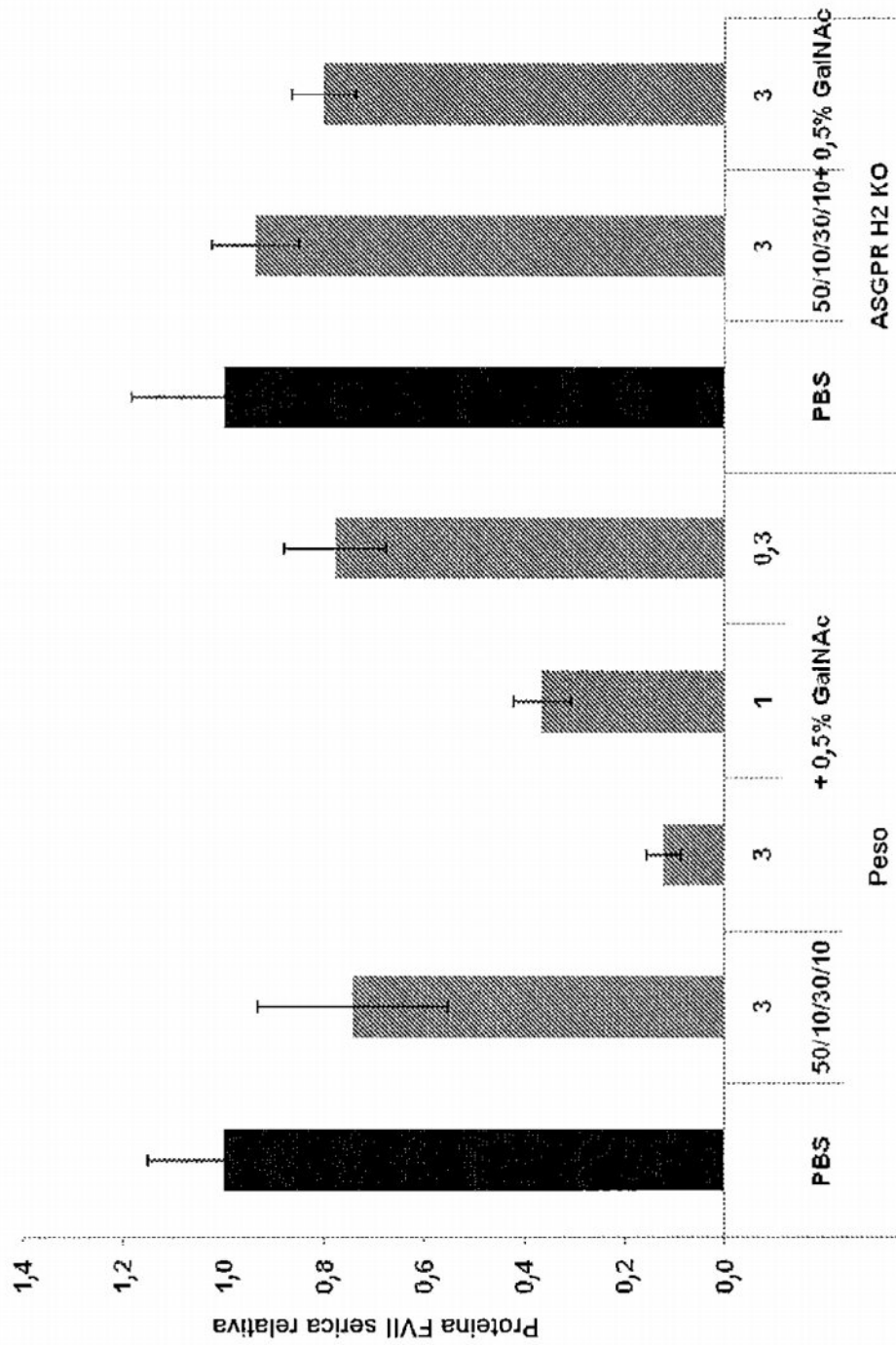


FIG. 8

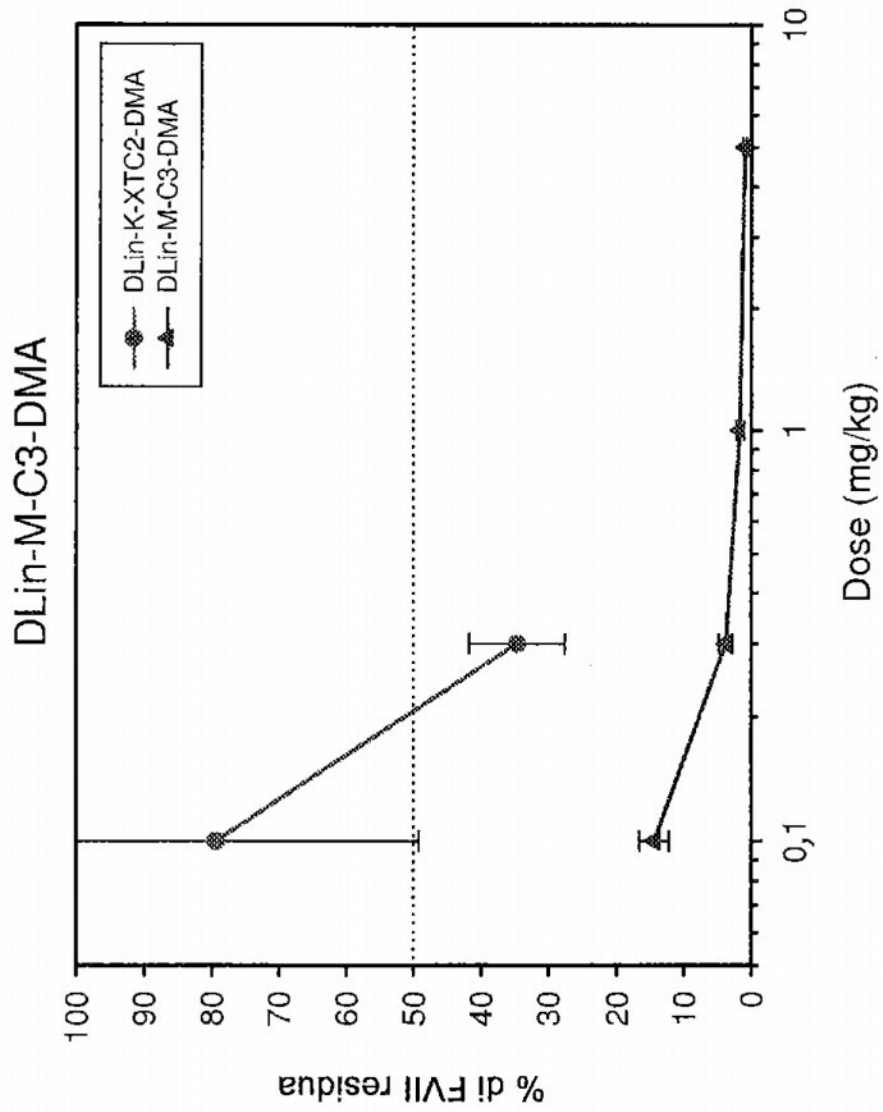


FIG. 9


 Ing. Marco Montebelli
 USBM CPI 001

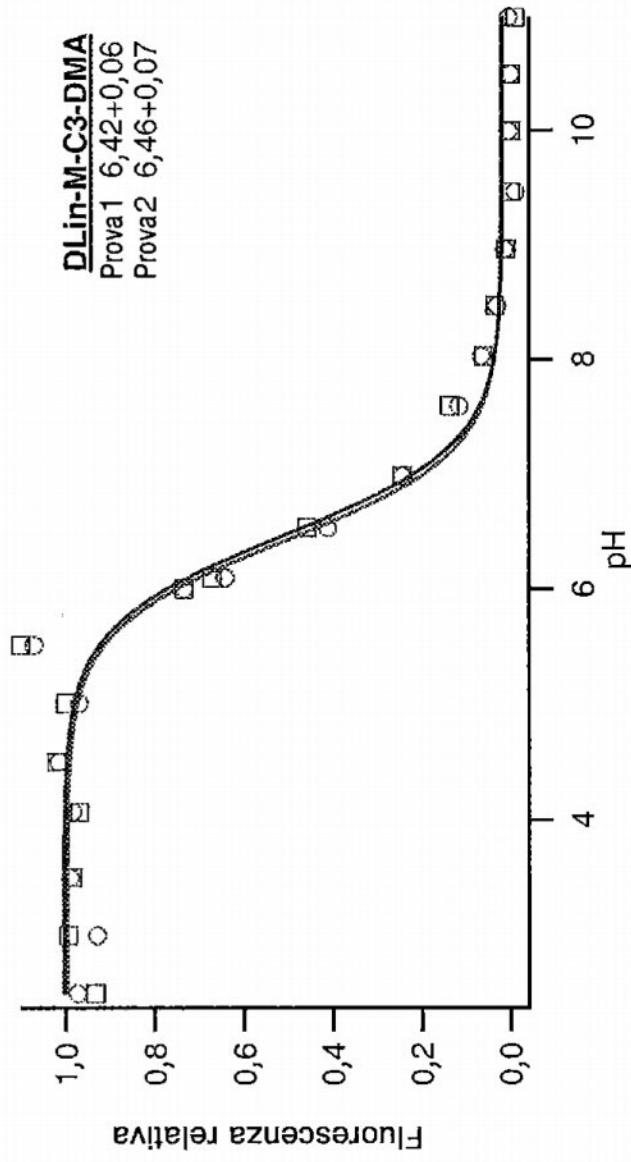


FIG. 10