



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019021771-1 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 1 7 7 1 A 2 *

(22) Data do Depósito: 19/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 05/05/2020

(54) Título: ÁCIDOS NUCLEICOS P-ETÓXI PARA INIBIÇÃO DE STAT3

(51) Int. Cl.: A61K 9/127; A61K 31/7125; A61K 47/54; A61K 47/69; A61P 35/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 19/04/2017 US 62/487,292.

(71) Depositante(es): BIO-PATH HOLDINGS, INC..

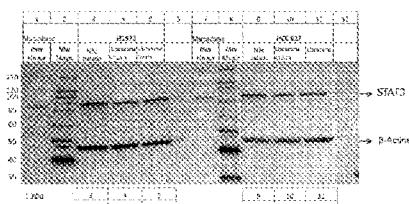
(72) Inventor(es): ANA TARI ASHIZAWA.

(86) Pedido PCT: PCT US2018028259 de 19/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/195249 de 25/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 16/10/2019

(57) Resumo: Trata-se de sistemas de distribuição aprimorados para oligonucleotídeos, sendo que o dito sistema de distribuição compreende um lipossomo que compreende fosfolipídios neutros e um P-etoxi-oligonucleotídeo, que tem como alvo um polinucleotídeo codificador de STAT3. Métodos de tratamento de pacientes com os ditos sistemas de distribuição também são fornecidos.



"ÁCIDOS NUCLEICOS P-ETÓXI PARA INIBIÇÃO DE STAT3"

[001]O presente pedido reivindica o benefício prioritário do pedido provisório número 62/487.292 dos Estados Unidos, depositado em 19 de abril de 2017, cujo conteúdo inteiro é incorporado no presente documento a título de referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. CAMPO DA INVENÇÃO

[002]A presente invenção refere-se geralmente ao campo da medicina. Mais particularmente, refere-se a formulações lipossômicas de oligonucleotídeos P-etóxi que hibridizam com um produto de gene polinucleotídeo *STAT3* e métodos de produção e utilização de tais formulações em medicina, ainda mais particularmente no tratamento de cânceres sólidos e hematológicos que têm alta expressão ou atividade aumentada do gene *STAT3*.

2. DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[003]Muitos genes estão implicados na proliferação e sobrevivência sustentadas de células cancerígenas em tumores refratários pré-malignos e avançados. Sabe-se que os membros das vias de sinalização do Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (STAT, "*Signal Transducer and Activator of Transcription*") desempenham um papel essencial nessa capacidade. STAT3 é um fator de transcrição que é superativado em cerca de 70% de todos os tumores sólidos e câncer de sangue. Quando STAT3 ativado é translocado do citosol para o núcleo para direcionar a expressão de um grande número de genes, incluindo Survivin, Bcl-X_L, Mcl-1, c-Myc, Ciclina D1, p21, Ciclina E, Matrix metaloproteinase-9 e -2 e VEGF para regular uma ampla gama de processos celulares, como sobrevivência, crescimento, migração, invasão, metástase e angiogênese celular (Wu *et al.*, 2011; Hardee *et al.*, 2013). Além disso, o STAT3 regula várias vias de sinalização

importantes envolvidas na progressão do câncer, incluindo as cascatas IL-3, IL-6 e NF-κB, além de ativar as vias de feedback que reforçam sua própria ativação (Hardee *et al.*, 2013).

[004]Enquanto o STAT3 é geralmente expresso em baixos níveis no citosol de células saudáveis, é frequentemente superexpressado e ativado (fosforilado e localizado no núcleo) no câncer, incluindo o linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). No DLBCL, é mais frequentemente ativado no subtipo ABC da doença e menos frequentemente no subtipo GC DLBCL (Wu *et al.*, 2011; Hardee *et al.*, 2013; Scuto *et al.*, 2011). É importante ressaltar que a superexpressão de STAT3, hiperfosforilação e localização nuclear se correlacionam com um pior prognóstico geral nesses tumores em comparação com tumores que expressam níveis mais baixos de STAT3. Além disso, os tumores com STAT3 superativado também exibem sinalização NF-κB aumentada no subtipo DLBCL ABC, sugerindo que a sinalização STAT3 desempenha um papel na progressão da DLBCL.

[005]Devido à natureza da proteína STAT3, é difícil projetar pequenas moléculas para direcionar diretamente sua atividade de sinalização, tornando-a um alvo ideal para abordagens antissenso e outras abordagens de knockdown genético. Dado o papel central que o STAT3 desempenha em tantas formas de câncer e outras doenças, houve várias tentativas, no entanto, de projetar peptídeos, oligonucleotídeo de isca e compostos baseados em pequenas moléculas para bloquear a ativação de STAT3, dimerização, ligação ao DNA ou acelerar a inativação da enzima (Miklossy *et al.*, 2013). Como uma abordagem alternativa, vários grupos estão trabalhando para desenvolver inibidores da Janus Quinase (JAK) para bloquear a fosforilação e ativação do STAT3 na LCL e outras doenças com sucesso variado (Amin *et al.*, 2003; Fagard *et al.*, 2013).

[006]As abordagens que visam o STAT3 envolvem especificamente o uso de oligonucleotídeos para bloquear a tradução do mRNA do *STAT3* em proteínas ou para induzir a degradação do RNA por meio de mecanismos RNaseH por *meio de* oligonucleotídeos antissenso (ASO) e tecnologia baseada em siRNA. Estas estratégias oferecem uma maneira de reduzir a toxicidade e são menos adaptáveis às mutações de resistência. Várias tentativas dessa abordagem para o STAT3 não foram bem-sucedidas. Assim, há uma necessidade de composições antissenso aprimoradas visando STAT3 para uso no tratamento de doenças.

SUMARIO DA INVENÇÃO

[007]São fornecidas no presente documento composições e métodos que induzem inibição do crescimento e/ou apoptose em uma ampla gama de células cancerígenas controladas pelo STAT3. A expressão da proteína STAT3 é impedida por um oligonucleotídeo não tóxico resistente a nuclease que tem como alvo polinucleotídeos que codificam STAT3 em combinação com um lipossomo neutro, eliminando assim o reservatório de proteína STAT3 disponível.

[008]Em uma modalidade, são proporcionadas composições compreendendo uma população de oligonucleotídeos que hibridizam com um gene de produto polinucleotídeo *STAT3*. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população são compostos de moléculas de nucleosídeo ligadas entre si através de ligações na cadeia principal de fosfato, em que pelo menos uma das ligações na cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo é uma ligação na cadeia principal de P-etóxi e em que não mais que 80% das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi. Em alguns aspectos, pelo menos uma das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações da cadeia principal de fosfodiéster. Em alguns

aspectos, os oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com qualquer uma das SEQ ID NOs:1 a 4. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 1. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 2. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 3. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 4. Em vários aspectos, os oligonucleotídeos da população inibem a expressão de STAT3. Em alguns aspectos, a composição é liofilizada.

[009]Em alguns aspectos, 10% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi; 20% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi; 30% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi; 40% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi; 50% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi; ou 60% a 70% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi, ou qualquer faixa derivável destas. Em alguns aspectos, 20% a 90% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster; 20% a 80% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster; 20% a 70% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster; 20% a 60% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster; 20% a 50% das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster; ou 30% a 40% das ligações

de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster, ou qualquer faixa derivável destas. Em vários aspectos, pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%, ou qualquer valor dentre estas, das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de P-etóxi. Em vários aspectos, no máximo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%, ou qualquer valor dentre estas, das ligações de cadeia principal de fosfato são ligações de cadeia principal de fosfodiéster. Em certos aspectos, as ligações de cadeia principal de fosfodiéster estão distribuídas pelos oligonucleotídeos. Sendo assim, os oligonucleotídeos não são moléculas químicas. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos não compreendem uma ligação de cadeia principal de fosforotioato.

[010]Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população têm um tamanho variando de 7 a 30 nucleotídeos. Em certos aspectos, os oligonucleotídeos da população têm um tamanho variando de 12 a 25 nucleotídeos. Em vários aspectos, os oligonucleotídeos da população têm um tamanho de pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos. A faixa de tamanho pode ser um tamanho médio dos oligonucleotídeos na população.

[011]Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população têm um tamanho médio de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos, em que não mais que 5, 6, 7, 8, 8, 9, 10, 11, 11, 12, 13, 14, 15, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20, 21, 22, 23 ou 24, respectivamente, das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos da população

têm um tamanho médio de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos e pelo menos 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6 ou 6, respectivamente, das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações da cadeia principal de fosfodiéster. A título de exemplo, os oligonucleotídeos da população podem ter um tamanho médio de 18 nucleotídeos, em que não mais do que 14 das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi; os oligonucleotídeos da população podem ter um tamanho médio de 20 nucleotídeos, em que não mais do que 16 das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi; os oligonucleotídeos da população podem ter um tamanho médio de 25 nucleotídeos, em que não mais do que 20 das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi; ou os oligonucleotídeos da população podem ter um tamanho médio de 30 nucleotídeos, em que não mais do que 24 das ligações de cadeia principal de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações de cadeia principal de P-etóxi.

[012]Em alguns aspectos, a população de oligonucleotídeos comprehende uma única espécie de oligonucleotídeos. Em outros aspectos, a população de oligonucleotídeos comprehende pelo menos duas espécies de oligonucleotídeos. Uma única espécie de oligonucleotídeo pode ter a mesma sequência nucleotídica, mas pode ter ou não ligações P-etóxi em posições diferentes dentro da molécula. Sendo assim, a população pode ser homogênea quanto à sequência de nucleotídeos e heterogênea quanto à distribuição das ligações de cadeia principal de fosfodiéster entre os oligonucleotídeos da população. Além disso, a população pode ser heterogênea quanto ao número de ligações de cadeia principal de P-etóxi e

ligações de cadeia principal de fosfodiéster entre os oligonucleotídeos da população. Como um exemplo não limitativo, uma primeira porção dos oligonucleotídeos da população pode ter 70% de ligações P-etóxi e 30% de ligações fosfodiéster, enquanto uma segunda porção dos oligonucleotídeos da população pode ter 60% de ligações P-etóxi e 40% ligações fosfodiéster. Em alguns aspectos, a população de oligonucleotídeos compreende oligonucleotídeos antissenso, RNAs interferentes curtos (siRNAs), microRNAs (miRNAs) ou piwiRNAs (piRNAs).

[013]Em vários aspectos, a composição compreende ainda fosfolipídeos. Em alguns aspectos, os fosfolipídeos e oligonucleotídeos estão presentes em uma razão molar de cerca de 5:1 a cerca de 100:1. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos e fosfolipídeos formam um complexo oligonucleotídico-lipídico, como, por exemplo, um complexo lipossômico. Em alguns aspectos, pelo menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% dos lipossomas têm menos de 5 microns de diâmetro. Em alguns aspectos, pelo menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% dos lipossomas têm menos de 4 microns de diâmetro. Em alguns aspectos, a população de oligonucleotídeos é incorporada na população de lipossomos.

[014]Em alguns aspectos, os fosfolipídeos não são carregados ou têm carga neutra no pH fisiológico. Em alguns aspectos, os fosfolipídeos são fosfolipídeos neutros. Em certos aspectos, os fosfolipídeos neutros são fosfatidilcolinas. Em certos aspectos, os fosfolipídeos neutros são dioleoilfosfatidilcolina. Em alguns aspectos, os fosfolipídeos são essencialmente livres de colesterol.

[015]Em uma modalidade, as composições farmacêuticas são fornecidas

compreendendo uma composição de oligonucleotídeos e fosfolipídeos das presentes modalidades e um carreador farmaceuticamente aceitável. Em alguns aspectos, a composição comprehende ainda um agente quimioterapêutico.

[016]Em uma modalidade, são fornecidos métodos para a entrega de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um oligonucleotídeo a uma célula que comprehendem o contato da célula com uma composição farmacêutica das presentes modalidades. Em alguns aspectos, o método é um método de tratamento de hiperplasia, câncer, uma doença autoimune ou uma doença infecciosa.

[017]Em uma modalidade, são fornecidos métodos para o tratamento de um sujeito com câncer, uma doença autoimune ou uma doença infecciosa comprendendo a administração ao sujeito de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica das presentes modalidades. Em alguns aspectos, o sujeito é humano. Em alguns aspectos, o câncer é um câncer de bexiga, sangue, linfoma, pâncreas, osso, medula óssea, cérebro, mama, cólon, esôfago, estômago, cabeça e pescoço, rim, fígado, pulmão, próstata, pele, testículo, língua, ovário ou útero. Em vários aspectos, o câncer é um adenocarcinoma de pulmão, uma leucemia, um linfoma, como, por exemplo, um linfoma difuso de células B grandes ou um adenocarcinoma ductal pancreático. Em alguns aspectos, a doença autoimune é lúpus eritematoso sistêmico, espondiloartropatia, doença de Sjögren, doença de Crohn, diabetes mellitus, esclerose múltipla ou artrite reumatoide. Em alguns aspectos, a doença infecciosa é uma infecção bacteriana, infecção fúngica, infecção viral ou infecção parasitária. Em alguns aspectos, a composição é administrada por via subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal. Em alguns aspectos, o método comprehende ainda a administração de pelo menos uma segunda terapia anticâncer ao sujeito. Em alguns aspectos, a segunda terapia

anticâncer é uma terapia cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, imunoterapia ou terapia com citocinas. Em alguns aspectos, a imunoterapia é uma terapia de bloqueio de ponto de verificação. Em alguns aspectos, a administração da composição reduz a expressão da proteína STAT3 no paciente.

[018]Um oligonucleotídeo inclui uma molécula de ácido nucleico antissenso que hibridiza especificamente com uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína-alvo ou regula a expressão da proteína-alvo. "Hibridação específica" significa que a molécula de ácido nucleico antissenso hibridiza com a molécula de ácido nucleico-alvo e regula sua expressão. De preferência, "hibridização específica" também significa que nenhum outro gene ou transcrito é afetado. Um oligonucleotídeo pode ser um ácido nucleico de cadeia simples e pode compreender 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais nucleobases. Em aspectos particulares, o oligonucleotídeo pode compreender 15 a 30, 19 a 25, 20 a 23 ou 21 nucleobases contíguas. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo inibe a tradução de um gene que promove o crescimento de uma célula de mamífero cancerígena ou pré-cancerosa ou hiperplásica (por exemplo, uma célula humana). Um oligonucleotídeo pode induzir apoptose na célula e/ou inibir a tradução de um oncogene ou outro gene alvo. Em certas modalidades, o componente oligonucleotídeo compreende uma única espécie de oligonucleotídeo. Em outras modalidades, o componente oligonucleotídeo compreende 2, 3, 4 ou mais espécies de oligonucleotídeo que têm como alvo 1, 2, 3, 4 ou mais genes. A composição pode ainda compreender um agente quimioterapêutico ou outro agente anticâncer, que pode ou não ser incorporado em um componente lipídico ou lipossomo da invenção. Em outras modalidades, o

componente oligonucleotídico é incorporado no lipossoma ou no componente lipídico.

[019]"Prender", "encapsular" e "incorporar" referem-se a o lipídeo ou lipossomo formar um impedimento para liberar a difusão na solução por uma associação com ou em torno de um agente de interesse, por exemplo, um lipossomo pode encapsular um agente dentro de uma camada lipídica ou dentro de um compartimento aquoso dentro ou entre camadas lipídicas. Em certas modalidades, a composição é compreendida em um carreador farmaceuticamente aceitável. O carreador farmaceuticamente aceitável pode ser formulado para administração a um sujeito ou paciente humano.

[020]Em certas modalidades, o componente lipídico tem uma carga essencialmente neutra porque comprehende um fosfolipídeo neutro ou uma carga neutra líquida. Em certos aspectos, um fosfolipídeo neutro pode ser uma fosfatidilcolina, como DOPC, fosfatidilcolina do ovo ("EPC"), dilauroilfosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), distearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), dilinoleoilfosfatidilcolina, 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocololina ("DAPC"), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocololina ("DEPC"), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("SPPC"), 1-palmitoil -2-oleoilfosfatidilcolina ("POPC"), 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("OPPC") ou lisofosfatidilcolina. Em outros aspectos, o fosfolipídeo neutro pode ser uma fosfatidiletanolamina, como dioleoilfosfatidiletanolamina ("DOPE"), distearoilfosfatidiletanolamina ("DSPE"), dimiristoil fosfatidiletanolamina ("DMPE"), dipalmitoil fosfatidiletanolamina ("DPPE"), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina ("POPE") ou lisofosfatidiletanolamina. Em certas

modalidades, o componente fosfolipídeo pode compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais tipos ou tipos de fosfolipídeo neutro. Em outras modalidades, um componente fosfolipídico pode compreender 2, 3, 4, 5, 6 ou mais tipos ou estilos de fosfolipídeos neutros.

[021]Em certas modalidades, um componente lipídico pode ter uma carga essencialmente neutra porque compreende um lipídeo carregado positivamente e um lipídeo carregado negativamente. O componente lipídico pode ainda compreender lipídeos ou fosfolipídeos carregados de maneira neutra. O lipídeo carregado positivamente pode ser um fosfolipídeo carregado positivamente. O lipídeo carregado negativamente pode ser um fosfolipídeo carregado negativamente. O fosfolipídeo carregado negativamente pode ser uma fosfatidilserina, como dimiristoil fosfatidilserina ("DMPS"), dipalmitoil fosfatidilserina ("DPPS") ou fosfatidilserina cerebral ("BPS"). O fosfolipídeo carregado negativamente pode ser um fosfatidilglicerol, como dilauroilfosfatidilglicerol ("DLPG"), dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dipalmitoilfosfatidilglicerol ("DPPG"), distearoiloilfosfatidilglicerol ("DSPG") ou dioleoiloilfosfatidilglicerol ("DOPG"). Em certas modalidades, a composição compreende ainda colesterol ou polietilenoglicol (PEG). Em outras modalidades, a composição é essencialmente livre de colesterol. Em certas modalidades, um fosfolipídeo é um fosfolipídeo de ocorrência natural. Em outras modalidades, um fosfolipídeo é um fosfolipídeo sintético.

[022]Os lipossomas podem ser feitos de um ou mais fosfolipídeos, desde que o material lipídico seja substancialmente não carregado. É importante que a composição esteja substancialmente livre de fosfolipídeos aniônicos e catiônicos e colesterol. Os fosfolipídeos adequados incluem fosfatidilcolinas e outros que são bem conhecidos por aqueles versados na área.

[023]Outro aspecto da presente invenção envolve métodos para a entrega de oligonucleotídeo a uma célula que compreende o contato da célula com uma composição lipídica neutra da invenção. Os métodos fornecerão uma composição inventiva em uma quantidade eficaz. Uma quantidade eficaz é uma quantidade de componente terapêutico que atenua, retarda, reduz ou elimina uma célula, afecção ou estado de doença em um sujeito. A célula pode estar compreendida em um sujeito ou paciente, como um humano. O método pode ainda compreender um método de tratamento de câncer ou outra afecção hiperplásica. O câncer pode ter se originado na bexiga, sangue, osso, medula óssea, cérebro, mama, cólon, esôfago, gastrointestina, gengiva, cabeça, rim, fígado, linfonodo, pulmão, nasofaringe, pescoço, próstata, pele, estômago, testículo, língua, ovário ou útero. Em certas modalidades, o método compreende ainda um método de tratamento de uma doença não cancerígena ou afecção hiperplásica. A célula pode ser uma célula pré-cancerosa ou cancerosa. Em certas modalidades, as composições e métodos inibem o crescimento da célula, induzem apoptose na célula e/ou inibem a tradução de um oncogene. O oligonucleotídeo pode inibir a tradução de um gene que é superexpresso na célula cancerosa.

[024]Em certas modalidades, os métodos da invenção compreendem ainda administrar uma terapia adicional ao sujeito. A terapia adicional pode compreender a administração de uma quimioterapia (por exemplo, paclitaxel ou docetaxel), uma cirurgia, uma radioterapia e/ou uma terapia genética. Em certos aspectos, a quimioterapia é docetaxel, paclitaxel, cisplatina (CDDP), carboplatina, procarbazina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalano, clorambucil, bussulfano, nitrosureia, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etoposídeo (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de

ligação ao receptor de estrogênio, taxol, gemcitabien, navelbina, inibidores de farnesil-proteína-transferase, transplatina, 5-fluorouracila, vincristina, vinblastina, metotrexato ou combinações dos mesmos. Em certas modalidades, a quimioterapia é um taxano como docetaxal ou paclitaxel. A quimioterapia pode ser entregue antes, durante, depois ou combinações das mesmas em razão a uma composição lipídica neutra da invenção. Uma quimioterapia pode ser entregue dentro de 0, 1, 5, 10, 12, 20, 24, 30, 48 ou 72 horas ou mais da composição lipídica neutra. A composição lipídica neutra, a segunda terapia anticâncer ou a composição lipídica neutra e a terapia anticâncer podem ser administradas intratumoralmente, intravenosamente, intraperitonealmente, subcutaneamente, oralmente ou por várias combinações das mesmas.

[025]Está contemplado que qualquer modalidade discutida neste relatório descritivo possa ser implementada com razão a qualquer método ou composição da invenção e vice-versa. Além disso, as composições da invenção podem ser usadas para alcançar os métodos da invenção.

[026]Como usado no presente documento, "essencialmente livre", em termos de um componente especificado, é usado no presente documento para significar que nenhum componente especificado foi propositadamente formulado em uma composição e/ou está presente apenas como contaminante ou em pequenas quantidades. A quantidade total do componente especificado resultante de qualquer contaminação não intencional de uma composição é, portanto, bem abaixo de 0,05%, preferencialmente abaixo de 0,01%. O mais preferido é uma composição na qual nenhuma quantidade do componente especificado pode ser detectada com métodos analíticos padrão.

[027]Conforme usado neste documento no relatório descritivo, "um" ou

"uma" pode significar um ou mais. Conforme usado neste documento nas reivindicações, quando usado em conjunto com a palavra "compreendendo", as palavras "um" ou "uma" podem significar um ou mais de um.

[028]O uso do termo "ou" nas reivindicações é usado para significar "e/ou", a menos que explicitamente indicado referindo-se apenas a alternativas ou as alternativas sejam mutuamente exclusivas, embora a divulgação apoie uma definição que se refira apenas a alternativas e "e/ou". Conforme usado no presente documento, "outro" pode significar pelo menos um segundo ou mais.

[029]Em todo este pedido, o termo "cerca de" é usado para indicar que um valor inclui a variação inerente de erro para o dispositivo, o método sendo empregado para determinar o valor ou a variação existente entre os sujeitos ao estudo.

[030]Outros objetos, características e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da descrição detalhada a seguir. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos, embora indiquem modalidades preferidas da invenção, são dados apenas como ilustração, uma vez que várias mudanças e modificações dentro do espírito e escopo da invenção se tornarão aparentes aos versados na técnica a partir desta descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[031]Os desenhos a seguir fazem parte do presente relatório descritivo e são incluídos para demonstrar adicionalmente certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser mais bem compreendida a título de referência a um ou mais desses desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas apresentadas no presente documento.

[032]Figura 1 - Inibição da expressão de STAT3 pelo STAT3 antissenso

lipossômico. A capacidade do STAT3 antissenso lipossômico de inibir a expressão de STAT3 foi testada em duas linhas celulares de adenocarcinoma de pulmão, H1975 e HCC 827. O STAT3 antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 (180 µg/ml) ou uma quantidade equivalente de lipossomas vazios foram incubados com cada linha celular por quatro dias.

[033]Figuras 2A a 2C - Inibição da viabilidade celular de câncer de pulmão de células não pequenas pelo STAT3 antissenso lipossômico. A capacidade do STAT3 antissenso lipossômico de inibir a viabilidade de células de câncer de pulmão de células não pequenas foi testada em três linhas celulares de adenocarcinoma de pulmão: H1975 (Figura 2A), HCC 827 (Figura 2B) e H358 (Figura 2C). O STAT3 antissenso lipossômico correspondente a uma das SEQ ID NOs: 1 a 4 foi incubado com cada linha celular por quatro dias.

[034]Figuras 3A e 3B - Inibição da viabilidade celular de leucemia e linfoma pelo STAT3 antissenso lipossômico. A capacidade do STAT3 antissenso lipossômico de inibir o crescimento de células de leucemia foi testada em três linhas celulares de leucemia humana (K-562, MV4-11 e Kasumi-1) (Figura 3A) e cinco linhas celulares de linfoma humano (DOHH-2, SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-10 e RL) (Figura 3B). O STAT3 antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 foi incubado com cada linha celular por quatro dias.

DESCRICÃO DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[035]A presente invenção fornece composições e métodos para a entrega de um oligonucleotídeo anti-STAT3 (por exemplo, um inibidor da expressão gênica) a uma célula através de uma composição lipídica, em certos aspectos uma composição lipídica com uma carga líquida de cerca de zero, isto é, uma composição lipídica neutra. Em certas modalidades, a composição lipídica é um

lipossomo não carregado. Esses métodos podem ser efetivamente usados para tratar um câncer ou uma doença autoimune.

I. LIPÍDEOS E LIPOSSOMAS

[036]"Lipossomas" é usado no presente documento para significar vesículas contendo lipídeos com uma bicamada lipídica, bem como outras partículas transportadoras de lipídeos que podem aprisionar ou incorporar oligonucleotídeos antissenso. Sendo assim, lipossoma é um termo genérico que abrange uma variedade de carreadores lipídicos unilamelares, multilamelares e multivesiculares formados pela geração de bicamadas ou agregados lipídicos fechados. Além disso, os lipossomas podem ter uma estrutura lamelar indefinida. Os lipossomas podem ser determinados como tendo estruturas vesiculares com uma membrana de bicamada fosfolipídica e um meio aquoso interno. Os lipossomas multilamelares têm múltiplas camadas lipídicas separadas por meio aquoso. Os mesmos se formam espontaneamente quando os fosfolipídeos são suspensos em excesso de solução aquosa. Os componentes lipídicos sofrem autorrearranjo antes da formação de estruturas fechadas e retêm água e solutos dissolvidos entre as bicamadas lipídicas (Ghosh e Bachhawat, 1991). No entanto, a presente invenção também abrange composições que possuem estruturas diferentes em solução que a estrutura vesicular normal. Por exemplo, os lipídeos podem assumir uma estrutura micelar ou simplesmente existir como agregados não uniformes de moléculas lipídicas.

[037]Os lipossomas são uma forma de nanopartículas que são transportadoras para a entrega de uma variedade de fármacos em um tecido doente. O tamanho ideal do lipossoma depende do tecido-alvo. No tecido tumoral, a vasculatura é descontínua e os tamanhos dos poros variam de 100 a 780 nm (Siwak *et al.*, 2002). Em comparação, o tamanho dos poros no endotélio vascular normal é

<2 nm na maioria dos tecidos e 6 nm nas vênulas pós-capilares. Pensa-se que os lipossomas com carga negativa são removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomas neutros ou com carga positiva; no entanto, estudos recentes indicaram que o tipo de lipídeo com carga negativa afeta a taxa de captação de lipossomos pelo sistema retículo-endotelial (RES). Por exemplo, lipossomas contendo lipídeos carregados negativamente que não são blindados estereoquimicamente (fosfatidilserina, ácido fosfatídico e fosfatidilglicerol) são eliminados mais rapidamente do que lipossomos neutros. Curiosamente, os lipossomas catiônicos (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano [DOTAP]) e os complexos DNA-lipossomo-catiônico-DNA são mais avidamente ligados e internalizados pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos angiogênicos por endocitose do que os lipossomas neutros aniônicos, neutros ou estericamente estabilizados (Thurston *et al.*, 1998; Krasnici *et al.*, 2003). Os lipossomas catiônicos podem não ser carreadores de entrega ideais para células tumorais porque as interações superficiais com as células tumorais criam um efeito de barreira do local de ligação derivado eletrostaticamente, inibindo ainda mais a associação dos sistemas de entrega com os esferoides do tumor (Kostarelos *et al.*, 2004). No entanto, os lipossomas neutros parecem ter melhor penetração intratumoral. A toxicidade com preparações lipossômicas específicas também tem sido uma preocupação. Os lipossomas catiônicos provocam toxicidade dependente da dose e inflamação pulmonar, promovendo a liberação de intermediários reativos de oxigênio, e esse efeito é mais pronunciado com lipossomos catiônicos multivalentes do que com lipossomos catiônicos monovalentes, como DOTAP (Dokka *et al.*, 2000). Lipossomas neutros e negativos não parecem exibir toxicidade pulmonar (Gutierrez-Puente *et al.*, 1999). Os lipossomas catiônicos, embora absorvendo de maneira

eficiente os ácidos nucleicos, tiveram sucesso limitado na regulação negativa de genes *in vivo*, talvez devido à sua natureza intracelular estável e à resultante falha na liberação do conteúdo de ácidos nucleicos. Os lipídeos com carga neutra ou as composições lipídicas com uma carga neutralizada, por exemplo, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocololina (DOPC), são utilizados no presente documento devido às propriedades neutras e ao sucesso no fornecimento de oligonucleotídeos antissenso *in vivo*.

[038]A presente invenção fornece métodos e composições para associar um oligonucleotídeo, como um oligonucleotídeo antissenso, com um lipídeo e/ou lipossomo. O oligonucleotídeo pode ser incorporado no interior aquoso de um lipossomo, intercalado na bicamada lipídica de um lipossomo, anexado a um lipossomo através de uma molécula de ligação que está associada ao lipossomo e ao oligonucleotídeo, aprisionado em um lipossomo, complexado com um lipossomo, disperso em uma solução contendo um lipídeo, misturado com um lipídeo, combinado com um lipídeo, contido como uma suspensão em um lipídeo, contido ou complexado com uma micela ou associado a outro lipídeo. As composições associadas a lipossomas ou lipossomas/oligonucleotídeos fornecidas no presente documento não estão limitadas a nenhuma estrutura específica em solução. Por exemplo, as mesmas podem estar presentes em uma estrutura de duas camadas, como micelas, ou com uma estrutura "colapsada". Os mesmos também podem simplesmente ser intercalados em uma solução, possivelmente formando agregados que não são uniformes em tamanho ou forma.

A. LIPÍDEOS

[039]Os lipídeos são substâncias gordurosas que podem ocorrer naturalmente ou sintéticas. Por exemplo, lipídeos incluem as gotículas de gordura

que ocorrem naturalmente no citoplasma, bem como a classe de compostos que são bem conhecidos dos especialistas na técnica que contêm hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa e seus derivados, como ácidos graxos, álcoois, aminas, aminoálcoois e aldeídos. Um exemplo é o lipídeo 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocololina (DOPC).

[040]As composições lipídicas da presente invenção podem compreender fosfolipídeos. Em certas modalidades, um único tipo ou estilo de fosfolipídeo pode ser utilizado na criação de composições lipídicas, como lipossomos. Em outras modalidades, mais de um tipo ou estilo de fosfolipídeo pode ser usado.

[041]Os fosfolipídeos incluem glicerofosfolipídeos e certos esfingolipídeos. Os fosfolipídeos incluem, mas não estão limitados a, dioleoilfosfatidilcolina ("DOPC"), fosfatidilcolina do ovo ("EPC"), dilaurililfosfatidilcolina ("DLPC"), dimiristoilfosfatidilcolina ("DMPC"), dipalmitoilfosfatidilcolina ("DPPC"), distearoilfosfatidilcolina ("DSPC"), dilinoleoilfosfatidilcolina, 1,2-diaracidoil-sn-glicero-3-fosfocololina ("DAPC"), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocololina ("DEPC"), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("MPPC"), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina ("PMPC"), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina ("PSPC"), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("SPPC"), palmitoilolofosfatidilcolina ("POPC"), 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina ("OPPC"), dilaurililfosfatidilglicerol ("DLPG"), dimiristoilfosfatidilglicerol ("DMPG"), dipalmitoilfosfatidilglicerol ("DPPG"), distearoilfosfatidilglicerol ("DSPG"), dioleoilfosfatidilglicerol ("DOPG"), ácido dimiristoil fosfatídico ("DMPA"), ácido dipalmitoil fosfatídico ("DPPA"), ácido distearoil fosfatídico ("DSPA"), ácido dioleoil fosfatídico ("DOPA"), dimiristoil fosfatidiletanamina ("DMPE"), dipalmitoilfosfatidiletanamina ("DPPE"), distearoilfosfatidiletanamina ("DSPE"), dioleoilfosfatidiletanamina ("DOPE"),

palmitoiloilofosfatidiletilamina ("POPE"), dimiristoil fosfatidilserina ("DMPS"), dipalmitoil fosfatidilserina ("DPPS"), fosfatidilserina cerebral ("BPS"), distearoil esfingomielina ("DSSP"), esfingomielina cerebral ("BSP"), dipalmitoil esfingomielina ("DPSP"), lisofosfatidicolina e lisofosfatidiletanolamina.

[042] Os fosfolipídeos incluem, por exemplo, fosfatidicolinas, fosfatidilgliceróis e fosfatidiletanolaminas; porque as fosfatidiletanolaminas e fosfatidicolinas não são carregadas sob condições fisiológicas (isto é, a cerca de pH 7), esses compostos podem ser particularmente úteis para gerar lipossomos neutros. Em certas modalidades, a DOPC fosfolipídica é usada para produzir lipossomos ou composições lipídicas sem carga. Em certas modalidades, um lipídeo que não é fosfolipídeo (por exemplo, colesterol) também pode ser usado.

[043] Os fosfolipídeos podem ser de fontes naturais ou sintéticas. No entanto, fosfolipídeos de fontes naturais, como fosfatidicolina de ovo ou soja, ácido fosfatídico cerebral, fosfatidilinositol cerebral ou vegetal, cardiolipina cardíaca e fosfatidiletanolamina vegetal ou bacteriana, não são usados em certas modalidades como o fosfatídeo primário (ou seja, constituindo 50% ou mais da composição total de fosfatídeo) porque isso pode resultar em instabilidade e vazamento dos lipossomas resultantes.

B. LIPOSSOMAS NEUTROS

[044] "Lipossomas ou composição lipídica neutros" ou "lipossomas ou composição lipídica não carregados", como usado no presente documento, são definidos como lipossomos ou composições lipídicas com um ou mais lipídeos que produzem uma carga líquida essencialmente neutra (substancialmente sem carga). Em certas modalidades, lipossomos ou composições lipídicas neutros podem incluir principalmente lipídeos e/ou fosfolipídeos que são os mesmos próprios neutros. Em

certas modalidades, lipídeos anfipáticos podem ser incorporados ou usados para gerar lipossomos ou composições lipídicas neutros. Por exemplo, um lipossoma neutro pode ser gerado pela combinação de lipídeos carregados positiva e negativamente, de modo que essas cargas se cancelem substancialmente umas às outras, produzindo assim uma carga líquida essencialmente neutra. Por "essencialmente neutro" ou "essencialmente sem carga", significa-se que poucos, se houver, lipídeos em uma determinada população (por exemplo, uma população de lipossomas) incluem uma carga que não é cancelada por uma carga oposta de outro componente (por exemplo, menos de 10% dos componentes incluem uma carga não cancelada, mais preferencialmente menos que 5% e mais preferencialmente menos que 1%). Em certas modalidades da presente invenção, uma composição pode ser preparada em que o componente lipídico da composição é essencialmente neutro, mas não está na forma de lipossomas.

[045]O tamanho dos lipossomas varia dependendo do método de síntese. Um lipossoma suspenso em uma solução aquosa geralmente tem a forma de uma vesícula esférica e pode ter uma ou mais camadas concêntricas de moléculas de bicamada lipídica. Cada camada consiste em uma matriz paralela de moléculas representadas pela fórmula XY, em que X é uma fração hidrofílica e Y é uma fração hidrofóbica. Na suspensão aquosa, as camadas concêntricas são dispostas de modo que as porções hidrofílicas tendam a permanecer em contato com uma fase aquosa e as regiões hidrofóbicas tendam a se autoassociar. Por exemplo, quando fases aquosas estão presentes no lipossomo, as moléculas lipídicas podem formar uma bicamada, conhecida como lamela, do arranjo XY-YX. Agregados de lipídeos podem se formar quando as partes hidrofílicas e hidrofóbicas de mais de uma molécula lipídica se associam umas às outras. O tamanho e a forma desses

agregados dependerão de muitas variáveis diferentes, como a natureza do solvente e a presença de outros compostos na solução.

[046]Os lipossomas dentro do âmbito da presente invenção podem ser preparados de acordo com técnicas de laboratório conhecidas, como, por exemplo, o método de Bangham *et al.* (1965), cujo conteúdo é incorporado no presente documento a título de referência; o método de Gregoriadis (1979), cujo conteúdo é incorporado no presente documento a título de referência; o método de Deamer e Uster (1983), cujo conteúdo é incorporado a título de referência; e o método de evaporação em fase reversa, como descrito por Szoka e Papahadjopoulos (1978). Os métodos acima mencionados diferem em suas respectivas habilidades para aprisionar material aquoso e em suas respectivas proporções aquosas de espaço para lipídeos.

[047]Em certas modalidades, um lipossomo neutro pode ser usado para fornecer um oligonucleotídeo, tal como um oligonucleotídeo antissenso. O lipossoma neutro pode conter uma única espécie de oligonucleotídeo direcionado para a supressão da tradução de um único gene, ou o lipossomo neutro pode conter várias espécies de oligonucleotídeos que são direcionados para a supressão da tradução de múltiplos genes. Além disso, o lipossoma neutro também pode conter um quimioterapêutico além do oligonucleotídeo; assim, em certas modalidades, um quimioterápico e um oligonucleotídeo podem ser entregues a uma célula (por exemplo, uma célula cancerígena em um sujeito humano) na mesma composição ou em composições separadas.

[048]Os lipídeos secos ou lipossomos liofilizados podem ser desidratados e reconstituídos em uma concentração apropriada com um solvente adequado (por exemplo, DPBS ou tampão Hepes). A mistura pode então ser agitada vigorosamente

em um misturador de vórtice. Os lipossomas podem ser ressuspensos em uma concentração total adequada de fosfolipídeos (por exemplo, cerca de 10 a 200 mM). O oligonucleotídeo não encapsulado pode ser removido por centrifugação a 29.000 g e os sedimentos lipossômicos lavados. Alternativamente, os oligonucleotídeos não encapsulados podem ser removidos por diálise contra um excesso de solvente. A quantidade de oligonucleotídeo encapsulado pode ser determinada de acordo com métodos padrão.

II. INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

[049]Um oligonucleotídeo inibitório pode inibir a transcrição ou tradução de um gene em uma célula. Um oligonucleotídeo pode ter de 5 a 50 ou mais nucleotídeos de comprimento e, em certas modalidades, de 7 a 30 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, o oligonucleotídeo pode ter 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos de comprimento. O oligonucleotídeo pode compreender um ácido nucleico e/ou um análogo de ácido nucleico. Tipicamente, um oligonucleotídeo inibidor inibirá a tradução de um único gene dentro de uma célula; no entanto, em certas modalidades, um oligonucleotídeo inibitório pode inibir a tradução de mais de um gene dentro de uma célula.

[050]Dentro de um oligonucleotídeo, os componentes do oligonucleotídeo não precisam ser do mesmo tipo ou homogêneos (por exemplo, um oligonucleotídeo pode compreender um nucleotídeo e um ácido nucleico ou análogo de nucleotídeo). Em certas modalidades da presente invenção, o oligonucleotídeo pode compreender apenas um único ácido nucleico ou análogo de ácido nucleico. O oligonucleotídeo inibitório pode compreender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 ou mais nucleobases contíguas, incluindo todas as faixas entre elas, que

hibridizam com um ácido nucleico complementar para formar uma estrutura de fita dupla.

III. ÁCIDOS NUCLEICOS

[051]A presente invenção fornece métodos e composições para a entrega de um oligonucleotídeo *via* lipossomos neutros. Como um oligonucleotídeo é composto de um ácido nucleico, métodos relacionados a ácidos nucleicos (por exemplo, produção de um ácido nucleico, modificação de um ácido nucleico, *etc.*) também podem ser utilizados em razão a um oligonucleotídeo.

[052]O termo "ácido nucleico" é bem conhecido na técnica. Um "ácido nucleico", como utilizado no presente documento, geralmente refere-se a uma molécula (isto é, uma fita) de DNA, RNA ou um derivado ou análogo do mesmo, compreendendo uma nucleobase. Estas definições referem-se a um ácido nucleico de fita simples ou dupla. Os ácidos nucleicos de cadeia dupla podem ser formados por ligação totalmente complementar; no entanto, em algumas modalidades, um ácido nucleico de fita dupla pode ser formado por ligação complementar parcial ou substancial. Como utilizado no presente documento, um ácido nucleico de fita simples pode ser indicado pelo prefixo "ss" e um ácido nucleico de fita dupla pelo prefixo "ds".

A. NUCLEOBASES

[053]Como usado no presente documento, uma "nucleobase" refere-se a uma base heterocíclica, como, por exemplo, uma nucleobase de ocorrência natural (ou seja, A, T, G, C ou U) encontrada em pelo menos um ácido nucleico de ocorrência natural (ou seja, DNA e RNA) e derivados ou análogos de ocorrência natural ou não natural e análogos de tal nucleobase. Uma nucleobase geralmente pode formar uma ou mais ligações de hidrogênio (isto é, "recozer" ou "hibridizar")

com pelo menos uma nucleobase de ocorrência natural de uma maneira que possa substituir o emparelhamento de nucleobase de ocorrência natural (por exemplo, a ligação de hidrogênio entre A e T, G e C, e A e U). Uma nucleobase pode ser compreendida em um nucleosídeo ou nucleotídeo, usando qualquer método de síntese química ou natural descrito no presente documento ou conhecido por um especialista na técnica.

[054]Nucleobases de "purina" e/ou "pirimidina" abrangem nucleobases de purina e/ou pirimidina de ocorrência natural e também derivado(s) e análogo(s), incluindo, mas não limitado a, uma purina ou pirimidina substituída por uma ou mais dentre uma porção alquila, carboxialquila, amino, hidroxila, halogênio (isto é, flúor, cloro, bromo ou iodo), tiol ou alquiltiol. As porções alquila (por exemplo, alquila, caboxialquila, etc.) preferidas compreendem de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 3, cerca de 4, cerca de 5, a cerca de 6 átomos de carbono. Outros exemplos não limitativos de uma purina ou pirimidina incluem deazapurina, 2,6-diaminopurina, 5-fluorouracila, xantina, hipoxantina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, bromotilina, 8-aminoguanina, uma 8-hidroxiguanina, uma 8-metilguanina, uma 8-tioguanina, uma azaguanina, uma 2-aminopurina, uma 5-etilcitosina, uma 5-metilcitosina, uma 5-bromouracila, uma 5-etiluracila, uma 5-iodouracila, uma 5-clorouracila, 5-propiluracila, tiouracila, 2-metiladenina, metiltioadenina, N,N-diemetiladenina, azaadeninas, 8-bromoadenina, 8-hidroxiadenina, 6-hidroxiaminopurina, 6-tiopurina, uma 4-(6-amino-hexil/citosina) e similares. Derivados ou análogos de purina e pirimidina incluem, mas não estão limitados a (abreviação/descrição da base modificada): ac4c/4-acetilcitidina, Mam5s2u/5-metoxiaminometil-2-tiouridina, Chm5u/5-(carboxi-hidroxilmetyl) uridina, Man q/Beta, D-manosilqueosina, Cm/2'-O-metilcitidina, McM5s2u/5-metoxicarbonilmetyl-2-tiouridina, Cmm5s2u/5-

carboximetilamino-metil-2-tioridina, Mcm5u/5-metoxicarbonilmetyluidina, Cmm5u/5-carboximetilaminometiluridina, Mo5u/5-metoxiuridina, D/Dihidrouridina, Ms2i6a, 2-methylthio-N6-isopenteniladenosina, Fm/2'-O-metilpseudouridina, Ms2t6a/N-((9-beta-D-ribofuranosil-2-metiltiopurina-6-il) carbamoila)treonina, Gal q/Beta, D-galactosilqueosina, Mt6a/N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)N-metilcarbamoil)treonina, Gm/2'-O-metilguanosina, Mv/ácido Uridina-5-oxiacético metiléster, I/inosina, o5u/ácido uridina-5-oxiacético (v), I6a/N6-isopenteniladenosina, Osiw/Wibutoxosina, m1a/1-metiladenosina, P/Pseudouridina, m1f/1-metilpseudouridina, Q/Quenosina, m1g/1-metilguanosina, s2c/2-tiocididina, m1l/1-metilinosina, s2t/5-metil-2-tiouridina, m22g/2,2-dimetilguanosina, s2u/2-tiouridina, m2a/2-metiladenosina, s4u/4-tiouridina, m2g/2-metilguanosina, T/5-metiluridina, m3c/3-metilcitidina, t6a/N-((9-beta-D-ribofuranosilpurina-6-il)carbamoil)treonina, m5c/5-metilcitidina, Tm/2'-O-metil-5-metiluridina, m6a/N6-metiladenosina, Um/2'-O-metiluridina, m7g/7-metilguanosina, Yw/Wibutosina, Mam5u/5-metilaminometiluridina ou X/3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina, (acp3)u.

B. NUCLEOSÍDEOS

[055]Como usado no presente documento, um "nucleosídeo" refere-se a uma unidade química individual compreendendo uma nucleobase covalentemente ligada a uma porção química ligante de nucleobase. Um exemplo não limitativo de uma "porção química ligante de nucleobase" é um açúcar que compreende átomos de 5 carbonos (ou seja, um "açúcar de 5 carbonos"), incluindo, mas não se limitando a, desoxirribose, ribose, arabinose ou derivado ou um análogo de um açúcar de 5 carbonos. Exemplos não limitativos de um derivado ou análogo de um açúcar de 5 carbonos incluem um 2'-fluoro-2'-desoxirribose ou um açúcar carbocíclico em que um carbono é substituído por um átomo de oxigênio, no anel de açúcar. Como

usado no presente documento, uma "porção química" geralmente se refere a um componente químico ou molecular menor de uma estrutura química ou molecular maior.

[056]Diferentes tipos de ligação(s) covalente(s) de uma nucleobase a uma porção química de ligante de nucleobase são conhecidos na técnica. A título de exemplo não limitativo, um nucleosídeo compreendendo uma nucleobase de purina (ou seja, A ou G) ou 7-deazapurina compreende tipicamente uma ligação covalente da posição 9 da purina ou 7-deazapurina na posição 1' de um açúcar de 5 carbonos. Em outro exemplo não limitativo, um nucleosídeo compreendendo uma nucleobase de pirimidina (ou seja, C, T ou U) normalmente compreende uma ligação covalente da posição 1 da pirimidina a uma posição 1' de açúcar de 5 carbonos (Kornberg e Baker, 1992).

C. NUCLEOTÍDEOS

[057]Como usado no presente documento, um "nucleotídeo" refere-se a um nucleosídeo que compreende ainda uma "ligação de cadeia principal". Uma ligação de cadeia principal geralmente liga covalentemente um nucleotídeo a outra molécula compreendendo um nucleotídeo ou a outro nucleotídeo para formar um ácido nucleico. A "ligação de cadeia principal" em nucleotídeos de ocorrência natural geralmente compreende uma fração fosfato (por exemplo, uma ligação de cadeia principal de fosfodiéster), que é covalentemente ligada a um açúcar de 5 carbonos. A ligação da porção química de cadeia principal ocorre tipicamente na posição 3' ou 5' do açúcar de 5 carbonos. No entanto, outros tipos de ligações são conhecidos na técnica, particularmente quando um nucleotídeo compreende derivados ou análogos de uma fração de açúcar ou fosfato de 5 carbonos que ocorre naturalmente.

D. ANÁLOGOS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

[058]Um ácido nucleico pode compreender, ou ser composto inteiramente de, um derivado ou análogo de uma nucleobase, uma porção de ligante de nucleobase e/ou ligação de cadeia principal que pode estar presente em um ácido nucleico de ocorrência natural. Como usado no presente documento, um "derivado" refere-se a uma forma quimicamente modificada ou alterada de uma molécula que ocorre naturalmente, enquanto os termos "imitação" ou "análogo" se referem a uma molécula que pode ou não se assemelhar estruturalmente a uma molécula ou porção química que ocorre naturalmente, mas possui funções semelhantes. Análogos ou derivados de nucleobase, nucleosídeo e nucleotídeo são bem conhecidos na técnica.

[059]Exemplos não limitativos de nucleosídeos, nucleotídeos ou ácidos nucleicos compreendendo açúcar de 5 carbonos e/ou derivados ou análogos de ligação de cadeia principal, incluem aqueles na Patente US 5.681.947 que descreve oligonucleotídeos compreendendo derivados de purina que formam hélices triplas com e/ou impedem a expressão de dsDNA; Pat. 5.652.099 e 5.763.167 que descrevem ácidos nucleicos incorporando análogos fluorescentes de nucleosídeos encontrados no DNA ou RNA, particularmente para uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; Pat. 5.614.617, que descreve análogos de oligonucleotídeos com substituições em anéis de pirimidina que possuem uma estabilidade de nuclease aprimorada; Pat. 5.670.663, 5.872.232 e 5.859.221 que descrevem análogos de oligonucleotídeos com açúcares de 5 carbonos modificados (isto é, porções 2'-desoxifuranosil modificadas) utilizados na detecção de ácidos nucleicos; Pat. 5.446.137, que descreve oligonucleotídeos compreendendo pelo menos uma fração de açúcar de 5 carbonos substituída na posição 4' por um substituinte diferente de hidrogênio que pode ser utilizado em ensaios de

hibridização; Pat. 5.886.165, que descreve oligonucleotídeos com ambos os desoxirribonucleotídeos com ligações de cadeia principal 3'-5' e ribonucleotídeos com ligações de cadeia principal 2'-5'; Pat. 5.714.606, que descreve uma ligação de cadeia principal modificada, em que um oxigênio na posição 3' da ligação de cadeia principal é substituído por um carbono para aumentar a resistência à nuclease de ácidos nucleicos; Pat. 5.672.697, que descreve oligonucleotídeos contendo uma ou mais ligações de cadeia principal de 5' metileno fosfonato que aumentam a resistência à nuclease; Pat. 5.466.786 e 5.792.847, que descrevem a ligação de uma fração substituinte que pode compreender um fármaco ou marcador ao carbono 2' de um oligonucleotídeo para fornecer estabilidade aprimorada da nuclease e capacidade de distribuir fármacos ou unidades de detecção; Pat. 5.223.618, que descreve análogos de oligonucleotídeos com uma ligação de cadeia principal de 2 ou 3 carbonos anexando a posição 4' e a posição 3' da porção química de açúcar de 5 carbonos adjacente para captação celular aprimorada, resistência a nucleases e hibridização com RNA alvo; Pat. 5.470.967, que descreve oligonucleotídeos compreendendo pelo menos uma ligação de sulfamato ou cadeia principal de sulfamida que é útil como sondas de hibridização de ácido nucleico; Pat. 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 e 5.602.240, que descrevem oligonucleotídeos com uma porção química de ligação de cadeia principal de três ou quatro átomos substituindo a ligação de cadeia principal de fosfodiéster usada para melhorar a resistência às nucleases, captação celular e regular a expressão de RNA; Pat. 5.858.988, que descreve o agente transportador hidrofóbico ligado à posição 2'-O dos oligonucleotídeos para aumentar sua permeabilidade e estabilidade da membrana; Pat. 5.214.136 que descreve oligonucleotídeos conjugados com antraquinona no terminal 5' que possuem hibridização aprimorada com DNA ou

RNA; estabilidade aprimorada para nucleases; Pat. 5.700.922, que descreve quimeras PNA-DNA-PNA em que o DNA compreende nucleotídeos 2'-desoxi-eritropentofaranosil para aumentar a resistência à nuclease, afinidade de ligação e capacidade de ativar a RNase H; Pat. 5.708.154 que descreve o RNA ligado a um DNA para formar um híbrido DNA-RNA; Pat. 5.908.845, que descreve ácidos nucleicos de poliéster em que uma ou mais nucleobases estão ligadas a átomos de carbono quirais em uma cadeia principal de poliéster; Pat. 5.786.461, 5.891.625, 5.786.461, 5.773.571, 5.766.855, 5.736.336, 5.719.262, 5.714.331, 5.539.082 e WO 92/20702 que descrevem ácidos nucleicos peptídicos (PNA ou análogo de ácido nucleico baseado em peptídeo; ou PENAM) que geralmente compreendem um ou mais nucleotídeos ou nucleosídeos que compreendem uma porção nucleobase, uma porção ligante de nucleobase que não é um açúcar de 5 carbonos (por exemplo, átomos de nitrogênio aza, amido e/ou amarras de ureido) e/ou uma ligação de cadeia principal que não é uma ligação de cadeia principal de fosfato (por exemplo, ligação de cadeia principal de aminoetilglicina, poliamida, polietila, polioamida, polissulfinamida ou polissulfonamida); e Pat. 5.855.911, que descreve a ligação de cadeia principal de P-etóxi hidrofóbico resistente a nuclease.

[060]Outras modificações e utilizações de análogos de ácidos nucleicos são conhecidas na técnica, e prevê-se que essas técnicas e tipos de análogos de ácidos nucleicos possam ser utilizados com a presente invenção.

E. PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

[061]Um ácido nucleico pode ser produzido por qualquer técnica conhecida dos versados na técnica, como síntese química, produção enzimática ou produção biológica. Exemplos não limitativos de um ácido nucleico sintético (por exemplo, um oligonucleotídeo sintético) incluem um ácido nucleico produzido por síntese química

in vitro usando química de fosfotriéster, fosfito ou fosforamidita e técnicas de fase sólida, como descrito no documento número EP 266.032, incorporado no presente documento a título de referência ou por intermediários desoxinucleosídeos H-fosfonato, como descrito por Froehler *et al.* (1986) e US Pat. 5.705.629, cada uma incorporada no presente documento a título de referência. Nos métodos da presente invenção, uma ou mais espécies de oligonucleotídeo podem ser usadas. Vários mecanismos de síntese de oligonucleotídeos foram divulgados, por exemplo, na US Pat. 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244, cada uma das quais é incorporada no presente documento a título de referência.

F. PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

[062]Um ácido nucleico pode ser purificado em géis de poliacrilamida, gradientes de centrifugação de cloreto de césio ou por qualquer outro meio conhecido dos versados na técnica (ver, por exemplo, Sambrook *et al.* (2001), incorporado no presente documento a título de referência).

[063]Em certas modalidades, a presente invenção refere-se a um ácido nucleico que é um ácido nucleico isolado. Conforme usado no presente documento, o termo "ácido nucleico isolado" refere-se a uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, uma molécula de RNA ou DNA) que foi isolada livre ou, de outra forma, livre da maioria dos ácidos nucleicos genômicos e transcritos de uma ou mais células. Em certas modalidades, "ácido nucleico isolado" refere-se a um ácido nucleico que foi isolado livre ou isento da maioria de componentes celulares ou componentes de reação *in vitro*, como, por exemplo, macromoléculas, como lipídeos ou proteínas, pequenas moléculas biológicas e similares.

G. HIBRIDIZAÇÃO

[064]Como usado no presente documento, "hibridização", "hibridiza" ou "capaz de hibridizar" é entendido como a formação de uma molécula de fita dupla ou tripla ou de uma molécula com natureza parcial dupla ou tripla de fita. O termo "recozimento", conforme usado no presente documento, é sinônimo de "hibridizar".

[065]Como usado no presente documento, "condição (ou condições) estrita(s)" ou "alta estringência" são aquelas condições que permitem a hibridização entre ou dentro de uma ou mais fitas de ácido nucleico que contêm sequência(s) complementar(es), mas impedem a hibridização de sequências aleatórias. Condições estritas toleram pouca ou nenhuma incompatibilidade entre um ácido nucleico e uma fita alvo. Tais condições são bem conhecidas dos versados na técnica e são preferidas para aplicações que requerem alta seletividade.

[066]Condições estritas podem compreender condições de baixo sal e/ou alta temperatura, tais como fornecidas por cerca de 0,02 M a cerca de 0,15 M de NaCl a temperaturas de cerca de 50 °C a cerca de 70 °C. Entende-se que a temperatura e a força iônica de uma estringência desejada são determinadas em parte pelo comprimento do(s) ácido(s) nucleico(s) específico(s), pelo comprimento e pelo conteúdo de nucleobases da(s) sequência(s)-alvo, pela composição de carga do(s) ácido(s) nucleico(s) e à presença ou concentração de formamida, cloreto de tetrametilâmônio ou outro(s) solvente(s) em uma mistura de hibridização.

[067]Entende-se também que esses intervalos, composições e condições para hibridização são mencionados apenas a título de exemplo não limitativo, e que a estringência desejada para uma reação de hibridização específica é frequentemente determinada empiricamente por comparação com um ou mais controles positivos ou negativos. Dependendo da aplicação prevista, é preferido empregar condições variadas de hibridização para alcançar graus variados de

seletividade de um ácido nucleico em razão a uma sequência-alvo. Em um exemplo não limitativo, a identificação ou isolamento de um ácido nucleico-alvo relacionado que não hibridiza com um ácido nucleico sob condições estritas pode ser alcançado por hibridização a baixa temperatura e/ou alta força iônica. Tais condições são denominadas "baixa estringência" ou "condições de baixa estringência", e exemplos não limitativos de baixo estringência incluem hibridização realizada em cerca de 0,15 M a cerca de 0,9 M de NaCl a uma faixa de temperatura de cerca de 20 °C a cerca de 50 °C. Obviamente, é da competência de um especialista na matéria modificar ainda mais as condições de estringência alta ou baixa para se adequar a uma aplicação específica.

IV. MÉTODO DE FABRICAÇÃO DE FÁRMACO LIPOSSÔMICO P-ETÓXI ANTISSENTO

[068]Os oligonucleotídeos (oligos) antissenso complementares a regiões específicas de um mRNA alvo foram utilizados para inibir a expressão de genes endógenos. Quando os oligonucleotídeos antissenso se ligam a um mRNA-alvo, um híbrido DNA-RNA é formado. Essa formação híbrida inibe a tradução do mRNA e, portanto, a expressão da proteína codificada. Se a proteína é essencial para a sobrevivência da célula, a inibição de sua expressão pode levar à morte celular. Portanto, os oligonucleotídeos antissenso podem ser ferramentas úteis em terapias anticâncer e antivirais.

[069]Os principais obstáculos no uso de oligonucleotídeos antissenso para inibir a expressão gênica são instabilidade celular, baixa captação celular e baixa entrega intercelular. Os fosfodiésteres naturais não são resistentes à hidrólise da nuclease; portanto, são necessárias altas concentrações de oligonucleotídeos antissenso antes que qualquer efeito inibitório seja observado. Análogos de

fosfodiéster modificados, como P-etóxi, foram feitos para superar esse problema de hidrólise de nuclease, mas os mesmos não forneceram uma solução satisfatória para o problema.

[070]A captação celular de oligonucleotídeos antissenso é baixa. Para resolver esse problema, técnicas físicas, como precipitação com fosfato de cálcio, mediação com DEAE-dextrano ou eletroporação, foram usadas para aumentar a captação celular de oligonucleotídeos. Essas técnicas são difíceis de reproduzir e são inaplicáveis *in vivo*. Lipídeos catiônicos, como Lipofectina, também foram utilizados para liberar oligonucleotídeos. Uma interação eletrostática é formada entre os lipídeos catiônicos e os oligonucleotídeos carregados negativamente, o que resulta em um complexo que é então absorvido pelas células-alvo. Uma vez que estes lipídeos catiônicos não protegem os oligonucleotídeos da digestão com nucleases e são prejudiciais para a membrana celular, apenas são úteis no fornecimento de fosforotioatos resistentes a nuclease, mas não de fosfodiésters de clivagem por nuclease.

[071]Outro análogo de fosfodiéster modificado que foi preparado é o P-etóxi. A cadeia principal antissenso P-etóxi não tem um efeito adverso sobre a ativação do sangramento e do complemento, que são algumas das toxicidades relatadas para outros análogos antissenso. As modificações de oligonucleotídeos P-etóxi são feitas na cadeia principal de fosfato, de modo que a modificação não interfira com a ligação desses oligonucleotídeos a um mRNA alvo. Os oligonucleotídeos P-etóxi são produzidos adicionando um grupo etila ao átomo de oxigênio sem ponte da cadeia principal de fosfato, tornando assim esses oligonucleotídeos compostos não carregados. Apesar de sua resistência às nucleases, a captação celular e a entrega intracelular de oligonucleotídeos P-etóxi são ruins porque, após a internalização,

esses oligonucleotídeos permanecem sequestrados dentro dos vacúolos endossômicos/lisossômicos, impedindo seu acesso ao mRNA-alvo.

A. PRODUTO DE FÁRMACO ANTISSENSO P-ETÓXI

[072]O fármaco lipossômico P-etóxi antissenso é composto por dois produtos cGMP, ambos com um Certificado de Análise exigido pela FDA com critérios de liberação aprovados pela FDA. As matérias-primas, solventes e produto de fármaco final são descritos no presente documento. Quando fabricado, o produto de fármaco é um cristal ou pó liofilizado de cor âmbar ou branca que compreende os seguintes materiais: oligonucleotídeo (por exemplo, substância de fármaco antissenso de P-etóxi), lipídeos neutros (por exemplo, DOPC) e tensoativo (por exemplo, polissorbato 20). Na preparação para administração a um paciente, solução salina normal é adicionada ao frasco, momento em que os lipossomas são formados com o antissenso P-etóxi incorporado no interior.

B. SUBSTÂNCIA DE FÁRMACO ANTISSENSO P-ETÓXI

[073]Propriedades físicas específicas (por exemplo, solubilidade e hidrofobicidade, que afetam a solubilidade do fármaco em soro fisiológico, incorporação de oligo nos lipossomas e tamanho das partículas de lipossomas) do produto acabado podem ser definidas usando uma mistura de matéria-prima pré-determinada P-etóxi e fosfodiéster amidita durante a produção da substância de fármaco antissenso P-etóxi. Embora a perda do grupo da cadeia principal de P-etóxi ocorra aleatoriamente durante a fabricação de oligonucleotídeos, resultando em ligações fosfodiéster nessas ligações, essa perda pode não gerar a proporção preferida de ligação de cadeia principal de P-etóxi : fosfodiéster dentro do oligonucleotídeo. Nesse caso, a mistura de matéria-prima P-etóxi e fosfodiéster amidita complementa o valor esperado das deleções na cadeia principal do P-etóxi,

gerando assim um oligonucleotídeo com a razão desejada. Aumentar o número de moléculas P-etóxi na cadeia principal do oligonucleotídeo faz com que a molécula seja mais hidrofóbica (o que resulta em partículas maiores de lipossomas; Tabela 1), menos polares e menos solúveis (Tabela 2). Os métodos de teste da substância de fármaco de P-etóxi hidrofóbica com carga neutra incluem espectrometria de massa para determinar a distribuição dos comprimentos de oligonucleotídeos e ensaios para determinar a solubilidade da substância de fármaco que, para propósitos práticos de solubilidade, é uma inspeção visual do produto de fármaco reconstituído em salina. À medida que o oligonucleotídeo se torna menos solúvel devido a um número maior de ligações de cadeia principal de P-etóxi, a solução reconstituída se torna mais branca até que as partículas se formem à medida que a hidrofobicidade se torna muito alta.

[074]A formulação deve usar um tamanho de partícula, em que o valor de 90% é menor que 5.000 nm e é solúvel, o que é uma função da composição de nucleotídeos. A título de exemplo, se um oligonucleotídeo tiver 18 a 20 nucleotídeos de comprimento, pelo menos cinco das ligações de cadeia principal de fosfato devem ser ligações de cadeia principal de fosfodiéster. Isso é apoiado pelas Experiências 7 a 10 abaixo na Tabela 1, que fornece dados de 18 oligonucleotídeos mer. Em que se um oligonucleotídeo tiver 25 nucleotídeos de comprimento, pelo menos seis das ligações de cadeia principal de fosfato devem ser ligações de cadeia principal do fosfodiéster.

TABELA 1. VARIABILIDADE DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DE LIPOSSOMAS COM COMPOSIÇÃO DE CADEIA PRINCIPAL ANTISSENTO

		Deleção de Etila da Cadeia principal Pós-Fabricação	Características de Tamanho de Partícula: Função de Distribuição Cumulativa
--	--	---	---

Experimento	Cadeia principal Antissenso Projetada	Pico ^d principal	Deleção de Compósito ^e	Valor de 90% (nm) **	Valor de 50% (nm)	Valor de 300 nm (%)
1	Substituição de 3 amiditos	-6	-5,67	2.130	911	15,30
2	Substituição de 3 amiditos	-6	-5,67	2.420	1.004	15,50
3	Substituição de 3 amiditos	-6	-6,12	3.682	943	15,50
4	Substituição de 3 amiditos	-7	-6,66	3.805	978	14,60
5	P-etóxi a 100%	-5	-5,66	3.924	976	16,00
6	Substituição de 2 amiditos	-5	-5,32	4.387	1.888	11,60
7 ^a	P-etóxi a 100%	-4	-4,22	5.057	1.131	17,70
8	P-etóxi a 100%	-4	-4,52	5.659	1.359	10,00
9 ^b	P-etóxi a 100%	-4	-4,38	7.571	1.909	2,60
10 ^c	P-etóxi a 100%	-4	-4,38	7.994	1.653	14,40

** O critério de liberação do fármaco é que 90% das partículas de lipossomo sejam menores ou iguais a 5.000 nm.

- a. Este lote foi descartado devido à baixa solubilidade; especificamente, partículas antisenso na solução reconstituída.
- b. Esse lote apresentou menor volume de DMSO e tBA com 2 mg de antisenso em um frasco de 20 ml, o que adicionou um componente adicional ao aumento do lipossoma.
- c. Este lote não foi lançado porque falhou na especificação de liberação do tamanho de partícula.
- d. O pico principal representa o número mais comum de deleções p-etóxi nos oligonucleotídeos da população.
- e. A deleção de compósito representa o número médio de deleções p-etóxi na população de oligonucleotídeos.

TABELA 2. SOLUBILIDADE DE PARTÍCULAS DE LIPOSSOMAS COM

COMPOSIÇÃO DE CADEIA PRINCIPAL ANTISSENTO

Experi mento	Cadeia Principal Antissenso Projetada	Deleção de Etapa do Cadeia Principal Pós-Fabricação		Solubilidade de Fármaco	
		Pico principal	Deleção de compósito	Observação visual **	Avaliação da Solubilidade
1	Substituição de 3 amiditos	-6	-5,67	solução de leite desnatado	boa
2	Substituição de 3 amiditos	-6	-5,67	solução de leite desnatado	boa
3	Substituição de 3 amiditos	-6	-6,12	solução de leite desnatado	boa
4	Substituição de 3 amiditos	-7	-6,66	solução de leite desnatado	boa
5	P-etóxi a 100%	-5	-5,66	solução de leite desnatado	boa
6	Substituição de 2 amiditos	-5	-5,32	solução de leite desnatado	boa
7	P-etóxi a 100%	-4	-4,52	solução branca	aprovada
8 ^b	P-etóxi a 100%	-4	-4,38	solução branca	aprovada
9 ^c	P-etóxi a 100%	-4	-4,38	solução branca	aprovada
10 ^a	P-etóxi a 100%	-4	-4,22	partículas de solução branca	reprovada

** Se a amostra do fármaco tiver partículas, o lote será rejeitado

- a. Este lote foi descartado devido à baixa solubilidade; especificamente, partículas antissenso na solução reconstituída.
- b. Esse lote apresentou menor volume de DMSO e tBA com 2 mg de antissenso em um frasco de 20 ml, o que adicionou um componente adicional ao aumento do lipossoma.
- c. Este lote não foi lançado porque falhou na especificação de liberação do tamanho de partícula.

C. FORMULAÇÃO, FILTRAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO DO FÁRMACO LIPOSSÔMICO P-ETÓXI ANTISSENTO

[075]Um grama (1 g) de oligos pE é dissolvido em DMSO na proporção de 10 mg de oligonucleotídeo por 1 ml de DMSO. Em seguida, a DOPC é adicionada ao álcool terc-butílico na proporção de 1 g de DOPC por 1.719 ml de álcool terc-butílico. O oligo e a DOPC são combinados e misturados na proporção de 1 g de oligonucleotídeo por 2,67 g de DOPC. Em seguida, 20 ml de uma solução de polissorbato 20 a 0,835% (v/v) são adicionados à mistura, resultando em uma concentração final de 0,039 mg/ml. A solução é passada através de um filtro estéril antes da distribuição em frascos de vidro para liofilização.

[076]O efeito do tensoativo no tamanho das partículas de lipossomas foi determinado por titulação da quantidade de tensoativo (Tabela 3). Na ausência de polissorbato 20, apenas 2,8% das partículas tinham um diâmetro de 300 nm ou menos. Na presença de 1x polissorbato 20, 12,5% das partículas tinham um diâmetro de 300 nm ou menos. Com a adição de 3x a 10x de polissorbato 20, cerca de 20% das partículas tinham um diâmetro de 300 nm ou menos. Assim, um aumento no tensoativo de 1x para 3x resulta em uma diminuição no tamanho das partículas.

TABELA 3. VARIABILIDADE DO TAMANHO DE PARTÍCULAS DE LIPOSSOMAS COM TENSOATIVO

Características de Tamanho de Partícula: Função de Distribuição Cumulativa				
Experimento	Quantidade de tensoativo	Valor de 50%	Valor de 90% **	Valor de 300 nm
1	0x	5.301 nm	10.719 nm	2,8%
2	1x	1.053 nm	4.054 nm	12,5%
3	3x	785 nm	2.926 nm	19,1%
4	5x	721 nm	2.691 nm	21,9%
5	10x	734 nm	2.937 nm	21,4%

** O critério de liberação do fármaco é que 90% das partículas de lipossomo sejam menores ou iguais a 5.000 nm.

D. PREPARAÇÃO DE FÁRMACO LIPOSSÔMICO P-ETÓXI ANTISSENTO PARA ADMINISTRAÇÃO

[077]A preparação liofilizada foi hidratada com solução salina normal (0,9%/NaCl 10 mM) a uma concentração final de oligo de 10 a 5.000 µM. Os oligos lipossomas-P-etóxi foram misturados por agitação manual.

E. MÉTODOS DE TESTE DE FÁRMACO LIPOSSÔMICO P-ETÓXI ANTISSENTO

[078]*Inspeção visual de produto de fármaco fabricado:* Após a fabricação, um frasco de amostra contendo fármaco é selecionado e inspecionado visualmente. A ausência de líquido é obrigatória e, em seguida, os cristais de âmbar no fundo do frasco são aceitáveis, e a aceitação de um pó ou aparência branca floculada aumenta o melhor resultado. A aparência branca indica um melhor processo de secagem, com uma alta razão superfície/massa, o que é muito propício à reconstituição para uso.

[079]*Inspeção visual do fármaco reconstituído pronto para o paciente IV:* É adicionada solução salina normal a um frasco para injetáveis que contém o fármaco antisenso lipossômico P-etóxi fabricado e agitada para reconstituir a solução com o cristal ou pó do fármaco completamente dissolvido. Três observações principais são feitas:1) que o cristal ou o pó está completamente dissolvido, 2) não existem aglomerados brancos de material não dissolvido e 3) a aparência é uma aparência branca leitosa ou de leite desnatado. Quanto mais azul a aparência do líquido reconstituído, melhor, pois isso sinaliza um tamanho menor de partícula lipossômica que reflete a luz no espectro azul.

[080] *Espectrometria de Massa:* A espectrometria de massa (especificação de massa) é usada para exibir o perfil das várias massas em uma amostra. Quando o material antissenso P-etóxi é produzido, uma especificação de massa é executada na amostra. O resultado mostra picos de material presente em uma grade que tem massa crescente no eixo "x" para a direita e abundância relativa de massa no eixo "y" aumentando para cima. O perfil de uma amostra é analisado para determinar a quantidade relativa de cadeias principais de P-etóxi na amostra P-etóxi, reconhecendo que o perfil de picos representa (começando o mais distante à direita), material de comprimento total com todas as cadeias principais compostas pela ligação P-etóxi, o próximo pico em movimento deixou um comprimento total com uma cadeia principal com uma deleção de P-etóxi (e, portanto, a etila sendo eliminado e o resultado sendo uma ligação de cadeia principal normal com fosfodiéster) e continuando. O padrão de especificação de massa deslocado para a direita representa uma amostra de P-etóxi com mais cadeias principais de P-etóxi e, portanto, tendo as propriedades de ser mais hidrofóbica e menos solúvel; e da mesma forma, deslocou-se para a esquerda, tendo os efeitos opostos. A inspeção do gráfico de especificações de massa de uma amostra também pode ser usada para determinar se a filtragem durante a fabricação produz efeitos adversos na composição de oligonucleotídeos presentes no fármaco filtrado.

[081] *Teste de UV:* O teste de luz ultravioleta é usado para determinar a massa de oligonucleotídeo presente em uma amostra. Os oligonucleotídeos absorvem a luz na faixa de 260 nanômetros. Como resultado, o teste UV do fármaco reconstituído acabado passou a ser utilizado como um método para determinar a quantidade de substância de fármaco oligonucleotídica em um frasco para injetáveis de fármaco. Em termos de desenvolvimento e inovações de fabricação, o teste de

UV foi usado para determinar se houve problemas durante a filtração na fabricação ou baixa solubilidade da substância de fármaco antissenso P-etóxi, resultando em menos oligonucleotídeo na solução e, portanto, uma menor leitura de UV. O método será validado e provavelmente se tornará parte do teste de liberação do produto final.

[082] *Tamanho de partícula de lipossoma:* Um frasco de fármaco acabado é reconstituído e testado quanto ao tamanho de partícula de lipossomo. O resultado é geralmente uma distribuição aproximadamente normal, com um ponto central, caudas e valores médios ou uma distribuição aproximadamente normal da maioria das partículas e picos secundários menores das partículas menores de lipossomas resultantes de efeitos de formação de partículas de segunda ordem. É importante que as partículas lipossômicas não sejam muito grandes, pois podem criar efeitos adversos nos pacientes (por exemplo, criar problemas de fluxo sanguíneo em vasos sanguíneos menores nos pulmões). Como resultado, os critérios de liberação do fármaco incluem que os testes de tamanho de partícula mostram que 90% dos lipossomas têm tamanho de 5 mícrons ou menos. Além disso, lipossomos menores são preferidos porque terão melhor absorção pelas células e, em segundo lugar, lipossomos menores podem penetrar nos poros vasculares, permitindo que os lipossomas penetrem nos tumores, aumentando a eficácia do tratamento de um fármaco lipossômico P-etóxi antissenso.

V. MÉTODOS DE TRATAMENTO

[083] Certos aspectos da presente invenção fornecem um complexo oligonucleotídeo-lipídico (por exemplo, um oligonucleotídeo incorporado a um lipossomo não carregado) para o tratamento de doenças, como câncer, doença autoimune ou doença infecciosa. Particularmente, o oligonucleotídeo pode ter uma

sequência que permita o pareamento de bases com uma sequência de nucleotídeos humanos e, assim, pode inibir a expressão de uma proteína codificada pela sequência de nucleotídeos humanos.

[084]"Tratamento" e "tratar" se referem à administração ou aplicação de um agente terapêutico a um sujeito ou à execução de um procedimento ou modalidade em um sujeito com a finalidade de obter um benefício terapêutico de uma doença ou afecção relacionada à saúde. Por exemplo, um tratamento pode incluir a administração de uma quantidade farmaceuticamente eficaz de um complexo oligonucleotídeo-lipídico.

[085]"Sujeito" e "paciente" se referem a humanos ou não humanos, como primatas, mamíferos e vertebrados. Em modalidades particulares, o sujeito é um humano.

[086]O termo "benefício terapêutico" ou "terapeuticamente eficaz", conforme usado ao longo deste pedido, refere-se a qualquer coisa que promova ou melhore o bem-estar do sujeito em relação ao tratamento médico dessa afecção. Isso inclui, mas não se limita a, uma redução na frequência ou gravidade dos sinais ou sintomas de uma doença. Por exemplo, o tratamento do câncer pode envolver, por exemplo, uma redução no tamanho de um tumor, uma redução na invasão de um tumor, redução na taxa de crescimento do câncer ou prevenção de metástases. O tratamento do câncer também pode se referir ao prolongamento da sobrevivência de um indivíduo com câncer. O tratamento de uma doença autoimune pode envolver, por exemplo, reduzir a expressão de um autoantígeno contra o qual existe uma resposta imune indesejada, induzir a tolerância de um autoantígeno contra o qual existe uma resposta imune indesejada ou inibir a resposta imune contra o autoantígeno. O tratamento de uma doença infecciosa pode envolver, por exemplo,

eliminar o agente infeccioso, reduzir o nível do agente infeccioso ou manter o nível do agente infeccioso em um determinado nível.

[087]Os tumores para os quais os presentes métodos de tratamento são úteis incluem qualquer tipo de célula maligna, como as encontradas em um tumor sólido, um tumor hematológico, câncer metastático ou câncer não metastático. Os tumores sólidos exemplificativos podem incluir, mas não estão limitados a, um tumor de um órgão selecionado do grupo que consiste em pâncreas, cólon, ceco, esôfago, gastrointestino, gengiva, fígado, pele, estômago, testículo, língua, útero, estômago, cérebro, cabeça, pescoço, ovário, rim, laringe, sarcoma, osso, pulmão, bexiga, melanoma, próstata e mama. Tumores hematológicos exemplificativos incluem tumores da medula óssea, doenças malignas das células T ou B, leucemias, linfomas, tais como, por exemplo, linfoma difuso de grandes células B, blastomas, mielomas e afins. Outros exemplos de cânceres que podem ser tratados usando os métodos fornecidos no presente documento incluem, entre outros, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, câncer de células escamosas, câncer de pulmão (incluindo câncer de pulmão de células pequenas, câncer de pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão e carcinoma escamoso do pulmão), câncer do peritônio, câncer hepatocelular, câncer de estômago ou gástrico (incluindo câncer gastrointestinal e câncer de estroma gastrointestinal), câncer de pâncreas (incluindo adenocarcinoma ductal pancreático), glioblastoma, câncer de colo de útero, câncer de ovário, câncer de fígado, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de cólon, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândula salivar, câncer renal ou de rim, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tireoide, vários tipos de câncer de cabeça e pescoço, melanoma, melanoma de espalhamento superficial, melanoma maligno do lentigo, melanomas

acrolentiginosos, melanomas nodulares e linfoma de células B (incluindo linfoma de baixo grau/folicular não-Hodgkin (NHL); NHL linfocítico pequeno (SL); NHL de grau intermediário/folicular; NHL difuso de grau intermediário; NHL imunoblástico de alto grau; NHL linfoblástico de alto grau; NHL de células pequenas não clivadas de alto grau; doença volumosa NHL; linfoma difuso de células B grandes; linfoma de células do manto; linfoma relacionado à AIDS; e macroglobulinemia de Waldenstrom), leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia de células cabeludas, mieloma múltiplo, leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloblástica crônica.

[088]O câncer pode ser especificamente do seguinte tipo histológico, embora não se limite a os mesmos: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes e fusiformes; carcinoma de pequenas células; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma basocelular; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transição; carcinoma de células de transição papilar; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado e colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide cístico; adenocarcinoma no pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, polipose coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma ramoíolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromofóbico; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar e folicular; carcinoma esclerosante não encapsulante; carcinoma adrenal cortical; carcinoma endometoide; carcinoma de apêndice da pele; adenocarcinoma apócrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma

mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células em anel de sinete; carcinoma do duto infiltrado; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatório; doença de paget mamária; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma com metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor estromal ovariano maligno; tecoma maligno; tumor de células granulosa, maligno; androblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células leydig maligno; tumor de células lipídicas maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamário, maligno; feocromocitoma; glomangiossarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de espalhamento superficial; melanoma maligno no nevo pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevo azul maligno; sarcoma; fibrossarcoma; histiocitoma fibroso maligno; mixossarcoma; lipossarcoma; leiomiossarcoma; rabdomiossarcoma; rabdomiossarcoma embrionário; rabdomiossarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor misto, maligno; tumor mulleriano misto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinossarcoma; mesênquima maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filódico maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionário; teratoma maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma maligno; hemangiossarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiossarcoma; osteossarcoma; osteossarcoma justacortical; condrossarcoma; condroblastoma maligno; condrossarcoma mesenquimal; tumor de células gigantes do osso; sarcoma de ewing; tumor odontogênico maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrossarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma

protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendrogioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebelar; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogênico olfativo; meningioma maligno; neurofibrossarcoma; neurilemmoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; doença de Hodgkin; hodgkin; paragranuloma; linfoma maligno pequeno linfocítico; linfoma maligno de células grandes difuso; linfoma maligno folicular; micose fungoide; outros linfomas não-hodgkin especificados; histiocitose maligna; mieloma múltiplo; sarcoma de mastócitos; doença imunoproliferativa do intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia celular de linfossarcoma; Leucemia mieloide; leucemia basofílica; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastócitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; e leucemia de células cabeludas.

[089]As doenças autoimunes para as quais os métodos de tratamento atuais são úteis incluem, sem limitação, lúpus eritematoso sistêmico, espondiloartropatia, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite reativa, artrite enteropática, diabetes mellitus, doença celíaca, doença tireoidiana autoimune, doença hepática autoimune, doença hepática autoimune, rejeição de transplante, doença do enxerto vs. hospedeiro, doença do hospedeiro vs. enxerto, colite ulcerosa, doença de Crohn, doença do intestino irritável, doença inflamatória do intestino, artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, febre familiar do Mediterrâneo, esclerose lateral amiotrófica, síndrome de Sjögren, artrite precoce, artrite viral, esclerose múltipla ou psoríase. O diagnóstico e tratamento dessas doenças estão bem documentados na literatura.

[090]As doenças infecciosas para as quais os presentes métodos de

tratamento são úteis incluem, sem limitação, infecções bacterianas, infecções virais, infecções fúngicas e infecções parasitárias. Exemplos de infecções virais incluem vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana 1, vírus da imunodeficiência humana 2, vírus do papiloma humano, vírus do herpes simplex 1, vírus do herpes simplex 2, herpes zoster, varicela zoster, coxsackievirus A16, citomegalovírus, vírus ebola, infecções por enterovírus, vírus Epstein-Barr, vírus hanta, vírus hendra, meningite viral, vírus sincicial respiratório, rotavírus, vírus do Nilo Ocidental, adenovírus e infecções por vírus influenza. Exemplos de infecções bacterianas incluem *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp (por exemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intraceluiar* e *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus do grupo A), o *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus do grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps anaeróbias.), *Streptococcus pneumoniae*, patogénico *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., de *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *perfringers* *Clostridium*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema Pallidum*, *Treponema pertenue*, infecções por *Leptospira*, *Rickettsia*, *Actinomyces israelii*, *Shigella* spp (por exemplo, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae*) e *Salmonella* spp. Infecções fúngicas exemplificativas incluem *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, infecções por *Blastomyces dermatitidis* e *Chlamydia*

irachomatis.

[091]O complexo oligonucleotídeo-lipídeo pode ser usado no presente documento como um agente antitumoral, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiparasitário ou antiautoimune em uma variedade de modalidades. Em uma modalidade particular, a invenção contempla métodos de utilização de um complexo oligonucleotídeo-lipídeo que compreendem o contato de uma população de células doentes com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um complexo oligonucleotídeo-lipídeo por um período de tempo suficiente para inibir ou reverter a doença.

[092]Em uma modalidade, o contato *in vivo* é realizado pela administração, por injeção intravenosa, intraperitoneal, subcutânea ou intratumoral, uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição fisiologicamente tolerável compreendendo um complexo oligonucleotídeo-lipídico desta invenção a um paciente. O complexo oligonucleotídeo-lipídeo pode ser administrado parentericamente por injeção ou por infusão gradual ao longo do tempo.

[093]As composições terapêuticas compreendendo o complexo oligonucleotídeo-lipídeo são convencionalmente administradas por via intravenosa ou subcutânea, como por injeção de uma dose unitária, por exemplo. O termo "dose unitária", quando utilizado em referência a uma composição terapêutica, refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagem unitária para o sujeito, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de material ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente necessário, ou seja, transportador ou carreador.

[094]As composições são administradas de uma maneira compatível com a formulação de dosagem e em uma quantidade terapeuticamente eficaz. A

quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado, da capacidade do sistema do indivíduo em utilizar o ingrediente ativo e do grau de efeito terapêutico desejado. Quantidades precisas de ingrediente ativo necessárias para administração dependem do julgamento do profissional e são peculiares a cada indivíduo. No entanto, são divulgadas no presente documento faixas de dosagem adequadas para aplicação sistêmica e dependem da via de administração. Os regimes adequados para administração inicial e de reforço também são contemplados e são tipificados por uma administração inicial seguida por doses repetidas em intervalos de uma ou mais horas por uma injeção subsequente ou outra administração. Exemplos de administrações múltiplas são descritos no presente documento e são particularmente preferidos para manter continuamente altos níveis séricos e de tecido de polipeptídeo. Alternativamente, a infusão intravenosa contínua suficiente para manter as concentrações no sangue nas faixas especificadas para terapias *in vivo* é contemplada.

[095]Está contemplado que um oligonucleotídeo da invenção possa ser administrado sistemicamente ou localmente para tratar doenças, como inibir o crescimento de células tumorais ou matar células cancerígenas em pacientes com câncer com câncer localmente avançado ou metastático. Os mesmos podem ser administrados por via intravenosa, intratecal, subcutânea e/ou intraperitoneal. Os mesmos podem ser administrados isoladamente ou em combinação com fármacos antiproliferativos. Em uma modalidade, os mesmos são administrados para reduzir a carga de câncer no paciente antes da cirurgia ou outros procedimentos. Como alternativa, os mesmos podem ser administrados após a cirurgia para garantir que qualquer câncer remanescente (por exemplo, câncer que a cirurgia não conseguiu eliminar) não sobreviva.

[096]Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um oligonucleotídeo é uma quantidade predeterminada calculada para alcançar o efeito desejado, *isto é*, para inibir a expressão de uma proteína-alvo. Assim, as faixas de dosagem para a administração de oligonucleotídeos da invenção são aquelas grandes o suficiente para produzir o efeito desejado. A dosagem não deve ser tão grande que cause efeitos colaterais adversos, como síndromes de hiperviscosidade, edema pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva, efeitos neurológicos e similares. Geralmente, a dosagem variará com a idade, afecção, sexo e extensão da doença no paciente e pode ser determinada por um especialista na técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico em caso de qualquer complicaçāo.

[097]Uma composição da presente invenção é preferencialmente administrada a um paciente parentericamente, por exemplo por injeção intravenosa, intra-arterial, intramuscular, intralinfática, intraperitoneal, subcutânea, intrapleural ou intratecal, ou pode ser usada ex vivo. As dosagens preferidas estão entre 5 a 25 mg/kg. A administração é preferencialmente repetida em um cronograma programado até o câncer desaparecer ou regredir, e pode estar em conjunto com outras formas de terapia.

VI. PREPARAÇĀOES FARMACÊUTICAS

[098]Uma composição farmacêutica compreendendo os lipossomas incluirá normalmente um carreador ou diluente estéril, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, como dextrose ou solução salina.

[099]Quando a aplicação clínica do componente lipídico não carregado (por exemplo, na forma de um lipossomo) contendo um oligonucleotídeo é realizada, geralmente será benéfico preparar o complexo lipídico como uma composição farmacêutica apropriada para a aplicação pretendida. Isso normalmente implica na

preparação de uma composição farmacêutica que é essencialmente livre de pirogênios, bem como quaisquer outras impurezas que possam ser prejudiciais a seres humanos ou animais. Pode-se também empregar tampões apropriados para tornar o complexo estável e permitir a captação pelas células alvo.

[0100]As frases "farmacêutico ou farmacologicamente aceitável" se referem a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação adversa, alérgica ou outra reação indesejada quando administradas a um animal, como um humano, conforme apropriado. A preparação de uma composição farmacêutica que contém pelo menos um componente lipídico não carregado compreendendo um oligonucleotídeo ou ingrediente ativo adicional será conhecida pelos especialistas na técnica à luz da presente divulgação, como exemplificado por Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st, 2005, incorporado no presente documento a título de referência. Além disso, para administração animal (por exemplo, humana), será entendido que as preparações devem atender aos padrões de esterilidade, pirogenicidade, segurança geral e pureza, conforme exigido pelo Escritório de Padrões Biológicos da FDA.

[0101]Como usado no presente documento, "transportador farmaceuticamente aceitável" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, revestimentos, tensoativos, antioxidantes, conservantes (por exemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotônicos, agentes retardadores de absorção, sais, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegração, lubrificantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, corantes, tais como materiais e combinações dos mesmos, como seria do conhecimento dos versados na técnica. Um carreador farmaceuticamente aceitável é preferencialmente formulado para administração a

um ser humano, embora em certas modalidades possa ser desejável usar um carreador farmaceuticamente aceitável que seja formulado para administração a um animal não humano, mas que não seria aceitável (por exemplo, devido a regulamentos governamentais) para administração a um ser humano. Exceto na medida em que qualquer carreador convencional é incompatível com o ingrediente ativo, seu uso nas composições terapêuticas ou farmacêuticas é contemplado.

[0102]A quantidade de dosagem real de uma composição da presente invenção administrada a um paciente ou sujeito pode ser determinada por fatores físicos e fisiológicos, tais como peso corporal, gravidade da afecção, tipo de doença a ser tratada, intervenções terapêuticas anteriores ou simultâneas, idiopatia do paciente e via de administração. O médico responsável pela administração determinará, em qualquer caso, a concentração do(s) ingrediente(s) ativo(s) em uma composição e a(s) dose(s) apropriada(s) para o indivíduo.

[0103]Em certas modalidades, as composições farmacêuticas podem compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 0,1% de um composto ativo. Em outras modalidades, o composto ativo pode compreender entre cerca de 2% a cerca de 75% do peso da unidade, ou entre cerca de 25% a cerca de 60%, por exemplo, e qualquer faixa nele derivável. Em outros exemplos não limitativos, uma dose também pode compreender de cerca de 1 micrograma/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 10 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 50 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 100 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 200 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 350 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 500 microgramas/kg/peso corporal, cerca de 1 miligrama/kg/peso corporal, cerca de 5 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 10 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 50 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 100 miligramas/kg/peso

corporal, cerca de 200 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 350 miligramas/kg/peso corporal, cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, a cerca de 1.000 mg/kg/peso corporal ou mais por administração, e qualquer faixa nele derivada. Em exemplos não limitativos de uma faixa derivável dos números listados no presente documento, uma faixa de cerca de 5 µg/kg/peso corporal a cerca de 1.000 mg/kg/peso corporal, cerca de 5 microgramas/kg/peso corporal a cerca de 500 miligramas/kg/peso corporal, etc., pode ser administrado.

[0104]Um oligonucleotídeo das presentes modalidades pode ser administrado em uma dose de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais µg de ácido nucleico por dose. Cada dose pode estar em um volume de 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1.000 ou mais µl ou ml.

[0105]As soluções de composições terapêuticas podem ser preparadas em água adequadamente misturada com um tensoativo, como a hidroxipropilcelulose. As dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, suas misturas e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e uso, essas preparações contêm um conservante para impedir o crescimento de micro-organismos.

[0106]As composições terapêuticas da presente invenção são vantajosamente administradas na forma de composições injetáveis, como soluções líquidas ou suspensões; também podem ser preparadas formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção. Estas preparações também podem ser emulsionadas. Uma composição típica para esse fim compreende um carreador farmaceuticamente aceitável. Por exemplo, a composição pode conter 10 mg, 25 mg, 50 mg ou até cerca de 100 mg de albumina sérica humana por mililitro de solução salina tamponada com fosfato. Outros carreadores farmaceuticamente

aceitáveis incluem soluções aquosas, excipientes não tóxicos, incluindo sais, conservantes, tampões e similares.

[0107] Exemplos de solventes não aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleo vegetal e ésteres orgânicos injetáveis, como etiloleato. Os carreadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, soluções salinas, carreadores parenterais como cloreto de sódio, dextrose de Ringer, etc. Os carreadores intravenosos incluem reabastecedores de fluidos e nutrientes. Conservantes incluem agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes e gases inertes. O pH e a concentração exata dos vários componentes da composição farmacêutica são ajustados de acordo com parâmetros bem conhecidos.

[0108] As composições terapêuticas da presente invenção podem incluir preparações farmacêuticas clássicas. A administração de composições terapêuticas de acordo com a presente invenção será por qualquer via comum, desde que o tecido-alvo esteja disponível por essa via. Isso inclui oral, nasal, bucal, retal, vaginal ou tópica. A administração tópica pode ser particularmente vantajosa para o tratamento de câncer de pele, para prevenir alopecia induzida por quimioterapia ou outro distúrbio hiperproliferativo dérmico. Alternativamente, a administração pode ser por injeção ortotópica, intradérmica, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa. Tais composições seriam normalmente administradas como composições farmaceuticamente aceitáveis que incluem transportadores fisiologicamente aceitáveis, tampões ou outros excipientes. Para o tratamento das condições dos pulmões, a administração de aerossóis pode ser usada. O volume do aerossol está entre cerca de 0,01 ml e 0,5 ml.

[0109] Uma quantidade eficaz da composição terapêutica é determinada com base no objetivo pretendido. O termo "dose unitária" ou "dosagem" refere-se a

unidades fisicamente distintas adequadas para uso em um sujeito, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada da composição terapêutica calculada para produzir as respostas desejadas discutidas acima em associação com sua administração, ou seja, a via e o regime de tratamento adequados. A quantidade a ser administrada, de acordo com o número de tratamentos e a dose unitária, depende da proteção ou efeito desejado.

[0110]Quantidades precisas da composição terapêutica também dependem do julgamento do praticante e são peculiares a cada indivíduo. Os fatores que afetam a dose incluem o estado físico e clínico do paciente, a via de administração, o objetivo pretendido do tratamento (por exemplo, alívio dos sintomas versus cura) e a potência, estabilidade e toxicidade da substância terapêutica específica.

VII. TRATAMENTOS COMBINADOS

[0111]Em certas modalidades, as composições e métodos da presente invenção envolvem um oligonucleotídeo inibitório, ou oligonucleotídeo capaz de expressar um inibidor da expressão gênica, em combinação com uma segunda ou terapia adicional. Os métodos e composições, incluindo terapias combinadas, aumentam o efeito terapêutico ou protetor e/ou aumentam o efeito terapêutico de outra terapia anticâncer ou anti-hiperproliferativa. Os métodos e composições terapêuticas e profiláticas podem ser fornecidos em uma quantidade combinada eficaz para alcançar o efeito desejado, como a morte de uma célula cancerígena e/ou a inibição da hiperproliferação celular. Esse processo pode envolver o contato das células com um inibidor da expressão gênica e com uma segunda terapia. Um tecido, tumor ou célula pode ser contatado com uma ou mais composições ou formulações farmacológicas, incluindo um ou mais dos agentes (isto é, inibidor da expressão gênica ou um agente anticâncer), ou entrando em contato com o tecido,

tumor e/ou célula com duas ou mais composições ou formulações distintas, em que uma composição fornece 1) um oligonucleotídeo inibitório; 2) um agente anticâncer, ou 3) um oligonucleotídeo inibidor e um agente anticâncer. Além disso, está contemplado que tal terapia combinada possa ser usada em conjunto com quimioterapia, radioterapia, terapia cirúrgica ou imunoterapia.

[0112]Um oligonucleotídeo inibitório pode ser administrado antes, durante, após ou em várias combinações em razão a um tratamento anticâncer. As administrações podem estar em intervalos que variam de concomitantemente a minutos a dias ou semanas. Nas modalidades em que o oligonucleotídeo inibitório é fornecido a um paciente separadamente de um agente anticâncer, geralmente seria garantido que um período de tempo significativo não expirasse entre o tempo de cada entrega, de modo que os dois compostos ainda pudessem exercer um efeito vantajoso combinado no paciente. Em tais casos, é contemplado que se possa fornecer a um paciente a terapia inibidora de oligonucleotídeo e a terapia anticâncer dentro de cerca de 12 a 24 ou 72 h uma da outra e, mais preferencialmente, dentro de cerca de 6 a 12 h uma da outra. Em algumas situações, pode ser desejável estender o período de tempo do tratamento de maneira significativa em que vários dias (2, 3, 4, 5, 6 ou 7) a várias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) passam entre as respectivas administrações.

[0113]Em certas modalidades, um período de tratamento durará 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 dias ou mais. Está contemplado que um agente possa ser administrado nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 e/ou 90, qualquer combinação dos mesmos e outra agente é dado no dia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 e/ou 90, ou qualquer combinação dos mesmos.

Dentro de um único dia (período de 24 horas), o paciente pode receber uma ou várias administrações do(s) agente(s). Além disso, após um curso de tratamento, é contemplado que existe um período de tempo em que nenhum tratamento anticâncer é administrado. Esse período pode durar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dias e/ou 1, 2, 3, 4, 5 semanas e/ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses ou mais, dependendo da afecção do paciente, como prognóstico, força, saúde, etc.

[0114] Várias combinações podem ser empregadas. Para o exemplo abaixo, uma terapia inibidora de oligonucleotídeo é "A" e uma terapia anticâncer ou uma terapia autoimune é "B":

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

[0115] A administração de qualquer composto ou terapia da presente invenção a um paciente seguirá protocolos gerais para a administração de tais compostos, levando em consideração a toxicidade, se houver, dos agentes.

Portanto, em algumas modalidades, há uma etapa de monitoramento da toxicidade que é atribuível à terapia combinada. Espera-se que os ciclos de tratamento sejam repetidos conforme necessário. Também está contemplado que várias terapias padrão, bem como a intervenção cirúrgica, possam ser aplicadas em combinação com a terapia descrita.

[0116]Em aspectos específicos, é contemplado que uma terapia padrão incluirá quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, terapia cirúrgica ou terapia genética e pode ser empregada em combinação com o inibidor da terapia de expressão gênica, terapia anticâncer ou ambos os inibidores da terapia de expressão gênica e a terapia anticâncer, como descrito no presente documento.

A. QUIMIOTERAPIA

[0117]Uma grande variedade de agentes quimioterapêuticos pode ser utilizada de acordo com as presentes modalidades. O termo "quimioterapia" refere-se ao uso de fármacos para tratar o câncer. Um "agente quimioterapêutico" é usado para conotar um composto ou composição que é administrada no tratamento de câncer. Esses agentes ou fármacos são categorizados por seu modo de atividade dentro de uma célula, por exemplo, se e em que estágio os mesmos afetam o ciclo celular. Alternativamente, um agente pode ser caracterizado com base na sua capacidade de reticular diretamente o DNA, intercalar no DNA ou induzir aberrações cromossômicas e mitóticas, afetando a síntese de ácidos nucleicos.

[0118]Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes alquilantes, como tiotepa e ciclosfosfamida; alquilsulfonatos, tais como bussulfano, improssulfano e pipossulfano; aziridinas, como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas, incluindo altretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamida, trietiletenofosfoteforamida e trimetilolomelamina; acetogeninas

(especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o topotecano análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesína); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictiina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida e mostarda uracila; nitrosureias, tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibióticos, como os antibióticos enedínicos (por exemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall e caliqueamicina omegal1); dinemicina, incluindo dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; bem como cromóforo neocarzinostatina e cromóforos antiobióticos relacionados com cromoproteína, aclacinomisinas, actinomicina, autarginina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-ovo-L-norleucina, doxorrubicina (incluindo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina e desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicina, olomicina, paliatina, olomicina, paliatina rodoarubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina e zorubicina; antimetabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracila (5-FU); análogos de ácido fólico, tais como denopterina, pteropterina e trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina e tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina,

doxifluridina, enocitabina e floxuridina; androgênios, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano e testolactona; antissuprarrenais, como mitotano e trilostano; reabastecedor de ácido fólico, como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracila; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; um epotilona; etoglucido; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinano; ionidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etil-hidrazida; procarbazina; Complexo de PSKpolissacarídeo; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazônico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazine; manustustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxoides, por exemplo, paclitaxel e docetaxel; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; complexos de coordenação de platina, como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; vinblastina; platina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; teniposídeo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecano (por exemplo, CPT-11); inibidor de topoisomerase RFS 2000; difluorometililornitina (DMFO); retinoides, como ácido retinoico; capecitabina; inibidores de carboplatina, procarbazina, plicomicina, gemcitabien, navelbina, farnesilproteinase transferase de proteína, transplatina e sais, ácidos ou derivados farmaceuticamente aceitáveis de qualquer um dos acima.

B. RADIOTERAPIA

[0119]Outros fatores que causam danos ao DNA e têm sido amplamente

utilizados incluem o que é comumente conhecido como raios- γ , raios-X e/ou entrega direcionada de radioisótopos às células tumorais. Também são contempladas outras formas de fatores prejudiciais ao DNA, como micro-ondas, irradiação por feixe de prótons (Patentes US Números 5.760.395 e 4.870.287) e irradiação por UV. É mais provável que todos esses fatores afetem uma ampla gama de danos no DNA, nos precursores do DNA, na replicação e reparo do DNA e na montagem e manutenção dos cromossomos. Os intervalos de dosagem para raios-X variam de doses diárias de 50 a 200 roentgens por períodos prolongados de tempo (3 a 4 semanas), a doses únicas de 2.000 a 6.000 roentgens. As faixas de dosagem para radioisótopos variam amplamente e dependem da meia-vida do isótopo, da força e do tipo de radiação emitida e da captação pelas células neoplásicas.

[0120]Os termos "contatado" e "exposto", quando aplicados a uma célula, são usados no presente documento para descrever o processo pelo qual uma construção terapêutica e um agente quimioterapêutico ou radioterapêutico são entregues a uma célula-alvo ou são colocados em justaposição direta com a célula-alvo. Para conseguir a morte celular, por exemplo, os dois agentes são entregues a uma célula em uma quantidade combinada eficaz para matar a célula ou impedir sua divisão.

C. IMUNOTERAPIA

[0121]No contexto do tratamento do câncer, a imunoterapêutica geralmente depende do uso de células e moléculas efetoras imunológicas para atingir e destruir as células cancerígenas. O trastuzumabe (HerceptinTM) é um exemplo. O efetor imunológico pode ser, por exemplo, um anticorpo específico para algum marcador na superfície de uma célula tumoral. O anticorpo sozinho pode servir como efetor da terapia ou pode recrutar outras células para realmente afetar a morte celular. O

anticorpo também pode ser conjugado a um fármaco ou toxina (quimioterapêutica, radionuclídeo, cadeia ricina A, toxina da cólera, toxina pertussis, etc.) e serve apenas como agente de direcionamento. Alternativamente, o efetor pode ser um linfócito carregando uma molécula de superfície que interage, direta ou indiretamente, com um alvo de célula tumoral. Várias células efetoras incluem células T citotóxicas e células NK. A combinação de modalidades terapêuticas, isto é, atividade citotóxica direta e inibição ou redução de ErbB2, proporcionaria benefício terapêutico no tratamento de cânceres superexpressores de ErbB2.

[0122]Outra imunoterapia também pode ser usada como parte de uma terapia combinada com terapia de silenciamento genético discutida acima. Em um aspecto da imunoterapia, a célula tumoral deve apresentar algum marcador passível de direcionamento, ou seja, que não está presente na maioria das outras células. Existem muitos marcadores tumorais e qualquer um deles pode ser adequado para direcionar no contexto da presente invenção. Marcadores tumorais comuns incluem antígeno carcinoembrionário, antígeno específico da próstata, antígeno associado a tumor urinário, antígeno fetal, tirosinase (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrogênio, receptor de laminina, erb B e p155. Um aspecto alternativo da imunoterapia é combinar efeitos anticâncer com efeitos estimuladores imunes. Também existem moléculas estimuladoras imunes, incluindo: citocinas como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gama-IFN, quimiocinas como MIP-1, MCP-1, IL-8 e fatores de crescimento como FLT3 ligando. A combinação de moléculas estimuladoras imunes, como proteínas, ou o uso da entrega de genes em combinação com um supressor de tumor, demonstrou aumentar os efeitos antitumorais. Além disso, os anticorpos contra qualquer um desses compostos podem ser utilizados para atingir os agentes anticâncer discutidos no presente

documento.

[0123] Exemplos de imunoterapias atualmente sob investigação ou em uso são adjuvantes imunológicos, por exemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenzeno e compostos aromáticos (Patentes dos EUA números 5.801.005 e 5.739.169; Hui e Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998), terapia com citocinas, por exemplo, interferóns α, β e γ; Terapia genética de IL-1, GM-CSF e TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998) terapia genética, por exemplo, TNF, IL-1, IL-2, p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward e Villaseca, 1998; Patentes US 5.830.880 e 5.846.945) e anticorpos monoclonais, por exemplo, antigangliosídeo GM2, anti-HER-2, anti-p185 (Pietras et al., 1998; Hanibuchi et al., 1998; Patente US 5.824.311). Está contemplado que uma ou mais terapias anticâncer possam ser empregadas com as terapias de silenciamento de genes descritas no presente documento.

[0124] Na imunoterapia ativa, um peptídeo, polipeptídeo ou proteína antigênicos, ou uma composição de células tumorais autólogas ou alógénicas ou "vacina", é administrada, geralmente com um adjuvante bacteriano distinto (Ravindranath e Morton, 1991; Morton et al., 1992; Mitchell et al. 1990; Mitchell et al., 1993).

[0125] Na imunoterapia adotiva, os linfócitos circulantes do paciente, ou linfócitos infiltrados em tumores, são isolados in vitro, ativados por linfocinas como IL-2 ou transduzidos com genes para necrose tumoral e readministrados (Rosenberg et al., 1988; 1989).

[0126] Em algumas modalidades, a imunoterapia pode ser um inibidor do ponto de verificação imune. Os pontos de verificação imunes aumentam um sinal (por exemplo, moléculas coestimuladoras) ou diminuem um sinal. Os pontos de

verificação imunes inibitórios que podem ser direcionados pelo bloqueio do ponto de verificação imune incluem o receptor A2A da adenosina (A2AR), B7-H3 (também conhecido como CD276), atenuador de linfócitos B e T (BTLA), proteína 4 citotóxica associada a linfócitos T (CTLA-4, também conhecida como CD152), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), imunoglobulina de células assassinas (KIR), gene-3 de ativação de linfócitos (LAG3), morte programada 1 (PD-1), domínio de imunoglobulina de células T e mucina domínio 3 (TIM-3) e supressor de Ig do domínio V da ativação de células T (VISTA). Em particular, os inibidores do ponto de verificação imune têm como alvo o eixo PD-1 e/ou CTLA-4.

[0127]Os inibidores do ponto de verificação imune podem ser fármacos como pequenas moléculas, formas recombinantes de ligante ou receptores ou, em particular, são anticorpos, como anticorpos humanos (por exemplo, Publicação de Patente Internacional WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12 (4): 252 a 264, 2012; ambos incorporados no presente documento a título de referência). Podem ser utilizados inibidores conhecidos das proteínas do ponto de verificação imune ou seus análogos, em particular podem ser utilizadas formas de anticorpos quimerizadas, humanizadas ou humanas. Como o especialista na técnica saberá, nomes alternativos e/ou equivalentes podem estar em uso para certos anticorpos mencionados na presente divulgação. Tais nomes alternativos e/ou equivalentes são intercambiáveis no contexto da presente divulgação. Por exemplo, sabe-se que o lambrolizumabe também é conhecido sob os nomes alternativos e equivalentes MK-3475 e pembrolizumabe.

[0128]Em algumas modalidades, o antagonista de ligação ao PD-1 é uma molécula que inibe a ligação do PD-1 aos seus parceiros de ligação ao ligando. Em um aspecto específico, os parceiros de ligação ao ligando PD-1 são PDL1 e/ou

PDL2. Em outra modalidade, um antagonista de ligação ao PDL1 é uma molécula que inibe a ligação do PDL1 aos seus parceiros de ligação. Em um aspecto específico, os parceiros de ligação ao PDL1 são PD-1 e/ou B7-1. Em outra modalidade, o antagonista de ligação ao PDL2 é uma molécula que inibe a ligação do PDL2 aos seus parceiros de ligação. Em um aspecto específico, um parceiro de ligação ao PDL2 é o PD-1. O antagonista pode ser um anticorpo, um seu fragmento de ligação ao antígeno, uma imunoadesina, uma proteína de fusão ou um oligopeptídeo. Anticorpos exemplificativos são descritos nas Patentes US Números 8.735.553, 8.354.509 e 8.008.449, todos incorporado no presente documentos a título de referência. Outros antagonistas do eixo PD-1 para uso nos métodos fornecidos no presente documento são conhecidos na técnica, como descrito nas Publicações de Patente US Números 20140294898, 2014022021 e 20110008369, todas incorporada no presente documentos a título de referência.

[0129]Em algumas modalidades, o antagonista de ligação ao PD-1 é um anticorpo anti-PD-1 (por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo químérico). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é selecionado do grupo que consiste em nivolumabe, pembrolizumabe e CT-011. Em algumas modalidades, o antagonista de ligação a PD-1 é uma imunoadesina (por exemplo, uma imunoadesina compreendendo uma porção de PDL1 ou PDL2 extracelular ou de ligação a PD-1 fundida a uma região constante (por exemplo, uma região Fc de uma sequência de imunoglobulina). Em algumas modalidades, o antagonista de ligação ao PD-1 é AMP-224. O nivolumabe, também conhecido como MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 e OPDIVO®, é um anticorpo anti-PD-1 descrito no documento número WO2006/121168. O pembrolizumabe, também conhecido como MK-3475, Merck 3475, lambrolizumabe, KEYTRUDA® e

SCH-900475, é um anticorpo anti-PD-1 descrito no documento número WO2009/114335. CT-011, também conhecido como hBAT ou hBAT-1, é um anticorpo anti-PD-1 descrito no documento número WO2009/101611. O AMP-224, também conhecido como B7-DCIg, é um receptor solúvel em fusão PDL2-Fc descrito nos documentos WO2010/027827 e WO2011/066342.

[0130]Outro ponto de verificação imune que pode ser direcionado nos métodos fornecidos no presente documento é a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), também conhecida como CD152. A sequência completa de cDNA do CTLA-4 humano possui o número de acesso ao Genbank L15006. O CTLA-4 é encontrado na superfície das células T e atua como um interruptor "desligado" quando ligado ao CD80 ou CD86 na superfície das células apresentadoras de抗ígenos. CTLA4 é um membro da superfamília da imunoglobulina que é expressa na superfície das células T auxiliares e transmite um sinal inibitório para as células T. O CTLA4 é semelhante à proteína coestimuladora de células T, CD28, e ambas as moléculas se ligam a CD80 e CD86, também chamadas B7-1 e B7-2, respectivamente, nas células apresentadoras de抗ígenos. O CTLA4 transmite um sinal inibitório para as células T, enquanto o CD28 transmite um sinal estimulador. O CTLA4 intracelular também é encontrado nas células T reguladoras e pode ser importante para sua função. A ativação de células T através do receptor de células T e CD28 leva ao aumento da expressão de CTLA-4, um receptor inibitório para moléculas B7.

[0131]Em algumas modalidades, o inibidor do ponto de verificação imune é um anticorpo anti-CTLA-4 (por exemplo, um anticorpo humano, um anticorpo humanizado ou um anticorpo químérico), um seu fragmento de ligação ao抗ígeno, uma imunoadesina, uma proteína de fusão ou um oligopeptídeo.

[0132]Anticorpos anti-CTLA-4 humano (ou domínios VH e/ou VL deles derivados) adequados para uso nos presentes métodos podem ser gerados usando métodos bem conhecidos na técnica. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos anti-CTLA-4 reconhecidos na técnica. Por exemplo, os anticorpos anti-CTLA-4 divulgados em: Patente US número 8.119.129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675.206, também conhecido como tremelimumabe; anteriormente ticilimumabe), Patente US número 6.207.156; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (17): 10.067 a 10.071; Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22 (145): Resumo número 2505 (anticorpo CP-675206); e Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res* 58: 5.301 a 5.304 podem ser utilizados nos métodos divulgados no presente documento. Os ensinamentos de cada uma das publicações acima mencionadas são incorporados no presente documentos a título de referência. Anticorpos que competem com qualquer um desses anticorpos reconhecidos na técnica para ligação ao CTLA-4 também podem ser usados. Por exemplo, um anticorpo CTLA-4 humanizado é descrito no Pedido de Patente Internacional número WO2001014424, WO2000037504 e Patente US número 8.017.114; todos incorporado no presente documentos a título de referência.

[0133]Um exemplo de anticorpo anti-CTLA-4 é o ipilimumab (também conhecido como 10D1, MDX-010, MDX-101 e Yervoy®) ou fragmentos de ligação ao antígeno e suas variantes (ver, por exemplo, WO 01/14424). Em outras modalidades, o anticorpo comprehende as CDRs ou VRs das cadeias pesada e leve do ipilimumab. Por conseguinte, em uma modalidade, o anticorpo comprehende os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região VH do ipilimumab e os domínios CDR1, CDR2 e CDR3 da região VL do ipilimumab. Em outra modalidade, o anticorpo compete pela ligação com e/ou se liga ao mesmo epítopo no CTLA-4 que os

anticorpos acima mencionados. Em outra modalidade, o anticorpo tem pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácidos da região variável com os anticorpos acima mencionados (por exemplo, pelo menos cerca de 90%, 95% ou 99% de identidade de região variável com ipilimumab).

[0134]Outras moléculas para modular CTLA-4 incluem ligantes e receptores de CTLA-4, tal como descrito nas patentes US Números 5844905, 5885796 e pedidos de patentes internacionais Números WO1995001994 e WO1998042752; todos incorporado no presente documentos a título de referência, e imunoadesinas como as descritas na Patente US 8329867, incorporada no presente documentos a título de referência.

[0135]Em algumas modalidades, a terapia imunológica pode ser imunoterapia adotiva, que envolve a transferência de células T específicas do antígeno autólogo geradas *ex vivo*. As células T usadas para imunoterapia adotiva podem ser geradas pela expansão de células T específicas ao antígeno ou pelo redirecionamento das células T por engenharia genética (Park, Rosenberg et al. 2011). Foi demonstrado que o isolamento e a transferência de células T específicas de tumores têm sucesso no tratamento de melanoma. Novas especificidades nas células T foram geradas com sucesso através da transferência genética de receptores transgênicos de células T ou receptores quiméricos de antígeno (CARs) (Jena, Dotti et al. 2010). Os CARs são receptores sintéticos que consistem em uma porção de direcionamento que está associada a um ou mais domínios de sinalização em uma única molécula de fusão. Em geral, a porção de ligação de um CAR consiste em um domínio de ligação ao antígeno de um anticorpo de cadeia única (scFv), compreendendo os fragmentos leves e variáveis de um anticorpo monoclonal unido por um ligante flexível. As porções de ligação baseadas nos domínios do

receptor ou ligando também foram usadas com sucesso. Os domínios de sinalização para os CARs de primeira geração são derivados da região citoplasmática das cadeias gama CD3zeta ou do receptor Fc. Os CARs permitiram com sucesso que as células T fossem redirecionadas contra抗ígenos expressos na superfície das células tumorais de várias neoplasias, incluindo linfomas e tumores sólidos (Jena, Dotti et al. 2010).

[0136]Em uma modalidade, o presente pedido fornece uma terapia de combinação para o tratamento de câncer, em que a terapia de combinação compreende terapia de células T adotiva e um inibidor de ponto de verificação. Em um aspecto, a terapia de células T adotiva compreende células T autólogas e/ou alogênicas. Em outro aspecto, as células T autólogas e/ou alogênicas são direcionadas contra抗ígenos tumorais.

D. CIRURGIA

[0137]Aproximadamente 60% das pessoas com câncer serão submetidas a cirurgia de algum tipo, que inclui cirurgia preventiva, diagnóstica ou estadiamento, curativa e paliativa. A cirurgia curativa é um tratamento de câncer que pode ser usado em conjunto com outras terapias, como o tratamento da presente invenção, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia genética, imunoterapia e/ou terapias alternativas.

[0138]A cirurgia curativa inclui ressecção na qual todo ou parte do tecido canceroso é fisicamente removido, excisado e/ou destruído. A ressecção tumoral refere-se à remoção física de pelo menos parte de um tumor. Além da ressecção do tumor, o tratamento cirúrgico inclui cirurgia a laser, criocirurgia, eletrocirurgia e cirurgia controlada microscopicamente (cirurgia de Mohs). É ainda contemplado que a presente invenção possa ser usada em conjunto com a remoção de cânceres

superficiais, pré-cânceres ou quantidades incidentais de tecido normal.

[0139]Por excisão de parte ou de todas as células, tecidos ou tumores cancerígenos, uma cavidade pode ser formada no corpo. O tratamento pode ser realizado por perfusão, injeção direta ou aplicação local da área com uma terapia anticâncer adicional. Esse tratamento pode ser repetido, por exemplo, a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias, ou a cada 1, 2, 3, 4 e 5 semanas ou a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses. Esses tratamentos também podem ter doses variadas.

E. OUTROS AGENTES

[0140]Está contemplado que outros agentes possam ser utilizados em combinação com certos aspectos das presentes modalidades para melhorar a eficácia terapêutica do tratamento. Esses agentes adicionais incluem agentes que afetam a regulação positiva dos receptores da superfície celular e junções GAP, agentes citostáticos e de diferenciação, inibidores da adesão celular, agentes que aumentam a sensibilidade das células hiperproliferativas a indutores apoptóticos ou outros agentes biológicos. O aumento da sinalização intercelular elevando o número de junções GAP aumentaria os efeitos anti-hiperproliferativos na população celular hiperproliferativa vizinha. Em outras modalidades, agentes citostáticos ou de diferenciação podem ser utilizados em combinação com certos aspectos das presentes modalidades para melhorar a eficácia anti-hiperproliferativa dos tratamentos. Inibidores da adesão celular são contemplados para melhorar a eficácia das presentes modalidades. Exemplos de inibidores de adesão celular são inibidores de adesão quinase focal (FAKs) e Lovastatina. É ainda contemplado que outros agentes que aumentam a sensibilidade de uma célula hiperproliferativa à apoptose, como o anticorpo c225, possam ser utilizados em combinação com certos aspectos das presentes modalidades para melhorar a eficácia do tratamento.

VIII. KITS E DIAGNÓSTICOS

[0141]Em vários aspectos da invenção, é previsto um kit contendo agentes terapêuticos e/ou outros agentes terapêuticos e de administração. Em algumas modalidades, a presente invenção contempla um kit para preparar e/ou administrar uma terapia da invenção. O kit pode compreender reagentes capazes de serem utilizados na administração de um ou mais agentes ativos ou eficazes da invenção. Os reagentes do kit podem incluir pelo menos um inibidor da expressão gênica (por exemplo, um oligonucleotídeo STAT3), um ou mais componentes lipídicos, um ou mais componentes anticâncer de uma terapia combinada, bem como reagentes para preparar, formular e/ou administrar os componentes da invenção ou executar uma ou mais etapas dos métodos inventivos.

[0142]Em algumas modalidades, o kit também pode compreender um meio de recipiente adequado, que é um recipiente que não reage com os componentes do kit, como um tubo eppendorf, uma placa de ensaio, uma seringa, uma garrafa ou um tubo. O recipiente pode ser feito de materiais esterilizáveis, como plástico ou vidro.

[0143]O kit pode incluir ainda uma folha de instruções que descreve as etapas processuais dos métodos e seguirá substancialmente os mesmos procedimentos descritos no presente documento ou são conhecidos dos versados na técnica.

IX. EXEMPLOS

[0144]Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas divulgadas nos exemplos a seguir representam técnicas as quais o inventor constatou funcionarem bem na prática da invenção e, portanto, podem ser consideradas como modos preferidos para sua prática. No entanto, aqueles

versados na técnica devem, à luz da presente divulgação, observar que muitas mudanças podem ser feitas nas modalidades específicas que são divulgadas e ainda obter-se um resultado semelhante ou similar sem se afastar do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLO 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS P-ETÓXI DIRECIONADOS A STAT3

[0145]Os oligonucleotídeos direcionados a *STAT3* foram projetados para uso em um fármaco *STAT3* antissenso lipossômico para inibir a expressão de *STAT3*. A sequência de cDNA contígua de *STAT3* é fornecida na SEQ ID NO: 5 e a sequência proteica de *STAT3* é fornecida na SEQ ID NO: 6. A sequência de cada um dos oligonucleotídeos é fornecida na Tabela 4.

TABELA 4. SEQUÊNCIAS ANTISSENSO STAT3

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

[0146]O fármaco *STAT3* antissenso lipossômico foi fabricado de acordo com os métodos descritos no presente documento. Os testes de espectrometria de massa mostraram que cerca de 80% da substância do fármaco oligonucleotídico tinha entre três e sete ligações de cadeia principal de fosfodiéster. O teste de partículas mostrou que 90% dos lipossomas tinham diâmetro de partículas de 2.319 nm ou menos, 50% dos lipossomas tinham diâmetro de partículas de 368 nm ou menos e cerca de 18% dos lipossomas tinham diâmetro de partículas de 300 nm ou menos.

EXEMPLO 2 - INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE STAT3 COM

OLIGONUCLEOTÍDEOS P-ETÓXI

[0147]A capacidade do *STAT3* antissenso lipossômico de inibir a expressão de *STAT3* foi testada em duas linhas celulares de adenocarcinoma de pulmão, H1975 e HCC 827. O *STAT3* antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 (180 µg/ml) ou uma quantidade equivalente de lipossomas vazios foi incubado com cada linha celular por quatro dias. Como os dados na Figura 1 mostram, a incubação com lipossomas *STAT3* antissenso lipossômico, mas não com lipossomas vazios, reduziu o nível de expressão de *STAT3* em razão à β-actina.

EXEMPLO 3 - INIBIÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULA CANCERÍGENA PELO STAT3 ANTISSENSO LIPOSSÔMICO

[0148]A capacidade do *STAT3* antissenso lipossômico de inibir a viabilidade de células de câncer de pulmão de células não pequenas foi testada em três linhas celulares de adenocarcinoma de pulmão: H1975, HCC 827 e H358. O *STAT3* antissenso lipossômico correspondente a uma das SEQ ID NO: 1 a 4 (180 µg/ml) foi incubado com cada linha celular por quatro dias. Como os dados nas Figuras Na mostra 2A a 2C, a incubação com *STAT3* antissenso lipossômico reduziu a viabilidade celular de cada linha celular, sendo o *STAT3* antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 o mais potente.

[0149]A capacidade do *STAT3* antissenso lipossômico de inibir o crescimento de células de leucemia foi testada em três linhas celulares de leucemia humana: K-562, MV4-11 e Kasumi-1. O *STAT3* antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 foi incubado com cada linha celular por quatro dias. Como os dados na Figura 3A mostram, a incubação com *STAT3* antissenso lipossômico reduziu a viabilidade celular de cada linha celular.

[0150]A capacidade do *STAT3* antissenso lipossômico de inibir o

crescimento de células de linfoma foi testada em cinco linhas celulares de linfoma humano: DOHH-2, SU-DHL-4, SU-DHL-6, SU-DHL-10 e RL. O *STAT3* antissenso lipossômico correspondente à SEQ ID NO: 4 foi incubado com cada linha celular por quatro dias. Como os dados na Figura 3B mostram, a incubação com *STAT3* antissenso lipossômico reduziu a viabilidade celular de cada linha celular.

* * *

[0151]Todos os métodos divulgados e reivindicados neste documento podem ser feitos e executados sem experimentação indevida à luz da presente divulgação. Embora as composições e métodos desta invenção tenham sido descritos em termos de modalidades preferidas, será evidente para os versados na técnica que variações podem ser aplicadas aos métodos e às etapas ou à sequência de etapas do método descrito no presente documento sem se afastar do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será aparente que certos agentes que estão relacionados quimicamente e fisiologicamente podem ser substituídos pelos agentes descritos no presente documento, enquanto os mesmos resultados ou resultados semelhantes são alcançados. Todos esses substitutos e modificações semelhantes aparentes aos especialistas na técnica são considerados dentro do espírito, escopo e conceito da invenção, conforme definido pelas reivindicações anexas.

REFERÊNCIAS

[0152]As referências a seguir, na medida em que fornecem detalhes processuais ou outros exemplos exemplificativos suplementares aos estabelecidos no presente documento, estão especificamente incorporadas no presente documento a título de referência.

Pat. número 4.659.774

Pat. número 4.816.571
Pat. número 4.870.287
Pat. número 4.959.463
Pat. número 5.141.813
Pat. número 5.214.136
Pat. número 5.223.618
Pat. número 5.264.566
Pat. número 5.378.825
Pat. número 5.428.148
Pat. número 5.446.137
Pat. número 5.466.786
Pat. número 5.470.967
Pat. número 5.539.082
Pat. número 5.554.744
Pat. número 5.574.146
Pat. número 5.602.240
Pat. número 5.602.244
Pat. número 5.610.289
Pat. número 5.614.617
Pat. número 5.623.070
Pat. número 5.652.099
Pat. número 5.670.663
Pat. número 5.672.697
Pat. número 5.681.947
Pat. número 5.700.922

Pat. número 5.705.629
Pat. número 5.708.154
Pat. número 5.714.331
Pat. número 5.714.606
Pat. número 5.719.262
Pat. número 5.736.336
Pat. número 5.739.169
Pat. número 5.760.395
Pat. número 5.763.167
Pat. número 5.766.855
Pat. número 5.773.571
Pat. número 5.777.092
Pat. número 5.786.461
Pat. número 5.792.847
Pat. número 5.801.005
Pat. número 5.824.311
Pat. número 5.830.880
Pat. número 5.846.945
Pat. número 5.855.911
Pat. número 5.858.988
Pat. número 5.859.221
Pat. número 5.872.232
Pat. número 5.886.165
Pat. número 5.891.625
Pat. número 5.908.845

- Pat. número 9.744.187
- Amin et al., *Oncogene*, 22: 5.399 a 5.407, 2013.
- Austin-Ward e Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126 (7): 838 a 845, 1998.
- Bailey e Sullivan, *Biochimica Biophys. Atos.* 239 a 252, 2000.
- Bangham et al., *J. Mol. Biol.*, 13 (1): 253 a 259, 1965.
- Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4 (10): 2.337 a 2.347, 1998.
- Christodoulides et al., *Microbiology*, 144 (Pt 11): 3.027 a 3.037, 1998.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21 (5): 389 a 398, 1998.
- Deamer e Uster, In: *Preparação de lipossomas: Métodos e Mecanismos*, Ostro (Ed.), Lipossomas, 1983.
- Dokka et al., *Pharm Res*, 17: 521 a 525, 2000.
- duBois et al., *J. Clin Oncol*, 17: 46 a 51, 1999.
- Dubey et al., *J. Drug Target*, 12: 257 a 264, 2004.
- Duxbury et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311: 786 a 792, 2003.
- Duxbury et al., *Oncogene*, 23: 1.448 a 1.456, 2004.
- Egholm et al., *Nature*, 365 (6446): 566 a 568, 1993.
- Elbashir et al., *Nature*, 411 (6836): 494 a 498, 2001.
- Pedido Europeu 01219
- Pedido Europeu 266.032
- Fagard et al., *JAKSTAT*, 2: e22882, 2013.
- Farhood et al., *Biochim. Biophys. Act*, 289 a 295, 1995.
- Fire et al., *Nature*, 391 (6669): 806 a 811, 1998.
- Flenniken et al., *Dev. Biol.*, 179: 382 a 401, 1996.
- Froehler et al., *Nucleic Acids Res.*, 14 (13): 5.399 a 5.407, 1986.
- Gabizon, *Cancer Invest.*, 19: 424 a 436, 2001.

Ghosh e Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87 a 104, 1991.

Gregoriadis, In: Drug Carriers in Biology and Medicine, Gregoriadis (Ed.), 287 a 341, 1979.

Gutierrez-Puente et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 291: 865 a 869, 1999.

Halder et al., Clinical Cancer Research, 11: 8.829 a 8.836, 2005.

Han et al., Ann Surg Oncol, 4: 264 a 268, 1997.

Hanibuchi et al., Int. J. Cancer, 78 (4): 480 a 485, 1998.

Hannon e Rossi, Nature, 431: 371 a 378, 2004.

Hardee et al., G3 (Bethesda) 3: 2.173 a 2.185, 2013.

Hassani et al., J. Gene Med., 7 (2): 198 a 207, 2005.

Hecker et al., Cancer Research, 62: 2.699 a 2.707, 2002.

Hellstrand et al., Acta Oncologica, 37 (4): 347 a 353, 1998.

Hortobagyi et al., J. Clin. Oncol., 19: 3.422 a 3.433, 2001.

Hsia et al., J. Cell Biol, 160: 753 a 767, 2003.

Hui e Hashimoto, Infection Immun., 66 (11): 5.329 a 5.336, 1998.

Jackson et al., Nat. Biotechnol., 21: 635 a 637, 2003.

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

Judson et al., Cancer, 86: 1.551 a 1.556, 1999.

Kaneda et al., Science, 243: 375 a 378, 1989.

Kato et al., J. Biol. Chem., 266: 3.361 a 3.364, 1991.

Kim et al., Nat. Biotechnol., 22: 321 a 325, 2004.

Kinch et al., Clin. Exp. Metastasis, 20: 59 a 68, 2003.

Klein et al., Gastroenterology, 125: 9 a 18, 2003.

- Kohno et al., Int J. Cancer, 97: 336 a 343, 2002.
- Kornberg e Baker, DNA Replication, 2^a Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- Kornberg et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 45: 4.463 a 4.469, 2004.
- Kornberg, Head Neck, 20: 634 a 639, 1998.
- Kostarelos et al., Int J Cancer, 112: 713 a 721, 2004.
- Krasnici et al., Int. J. Cancer, 105 (4): 561 a 567, 2003.
- Landen, Cancer Res, 65: 6.910 a 6.918, 2005.
- Langley et al., Cancer Research, 63: 2.971 a 2.976, 2003.
- Lewis et al., Cell, 115: 787 a 798, 2003.
- Lewis et al., Nat. Genet. 32: 107 a 108, 2002.
- Lori et al. J. Pharmacogenomics, 2: 245 a 252, 2002.
- Matsuda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101: 16 a 22, 2004.
- McCaffrey et al., Nature, 418: 38 a 39, 2002.
- McGuire et al., New England Journal of Medicine, 334: 1 a 6, 1996.
- McLean et al., Expert Opin Pharmacother, 4: 227 a 234, 2003.
- Miklossy et al., Nat. Rev. Drug Discov., 12: 611 a 629, 2013.
- Miller et al., Biochemistry, 37 (37): 12.875 a 12.883, 1998.
- Mitchell et al., Ann. NY Acad. Sci., 690: 153 a 166, 1993.
- Mitchell et al., J. Clin. Oncol., 8 (5): 856 a 869, 1990.
- Mitra et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 56 a 68, 2005.
- Mitra et al., Proc Am Assoc Cancer Res, 2005.
- Morton et al., Arch. Surg. 127: 392 a 399, 1992.
- Nemoto et al., Pathobiology, 65: 195 a 203, 1997.
- Nicolau et al., Methods Enzymol., 149: 157 a 176, 1987.
- Noblitt et al., Cancer Gene Ther., 11: 757 a 766, 2004.

- Ogawa et al., Oncogene, 19: 6.043 a 6.052, 2000.
- Owens et al., Cancer Res, 55: 2.752 a 2.755, 1995.
- Park et al., Cancer Lett., 118: 153 a 160, 1997.
- Pedido PCT WO 92/20702
- Pedido PCT WO02/100435A1
- Pedido PCT WO03/015757A1
- Pedido PCT WO04/002453A1
- Pedido PCT WO04029213A2
- Pietras et al., Oncogene, 17 (17): 2.235 a 2.249, 1998.
- Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (24): 14.411 a 14.416, 1998.
- Ravindranath e Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303 a 329, 1991.
- Reich et al., Mol. Vis., 9: 210 a 216, 2003.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed. Mack Printing Company, 1.289 a 1.329, 1990.
- Rosenberg et al., Ann. Surg. 210 (4): 474 a 548, 1989.
- Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 319: 1.676, 1988.
- Ryther et al., Gene Ther., 12 (1): 5 a 11, 2004.
- Sambrook et al., In: Clonagem molecular, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Schaller e Parsons, Trends in Cell Biology, 3: 258 a 262, 1993.
- Schaller et al., Mol Biol Cell, 10: 3.489 a 3.505, 1999.
- Schaller, Biochim Biophys Acta, 1540: 1 a 21, 2001.
- Schaller, J. Endocrinol, 150: 1 a 7, 1996.
- Schaller, Trends Cell Biol, 3: 258 a 262, 1993.
- Scheit, In: Synthesis and Biological Function, Wiley-Interscience, NY, 171 a

172, 1980.

- Schlaepfer e Hunter, Trends in Cell Biology, 8: 151 a 157, 1998.
- Schlaepfer et al., Prog Biophys Mol Biol, 71: 435 a 78, 1999.
- Scuto et al., Cancer Res., 71: 3.182 a 3.188, 2011.
- Sein et al., Oncogene, 19: 5.539 a 5.542, 2000.
- Sheta et al., J. Natl Cancer Inst. 92: 1.065 1.073, 2000.
- Shibata et al., Cancer Res, 58: 900 a 903, 1998.
- Sieg et al., Nat Cell Biol, 2: 249 a 256, 2000.
- Sioud e Sorensen, Biochem. Biophys. Res. Comm., 312: 1.220 a 1.225, 2003.
- Siwak et al., Clin Cancer Res, 8: 955 a 956, 2002.
- Sledz et al., Nat. Cell Biol., 5: 834 a 839, 2003.
- Song et al., Nature Med. 9: 347 a 351, 2003.
- Sonoda et al., Journal of Biological Chemistry, 275: 16.309 a 16.315, 2000.
- Sood et al., Am J. Pathol, 165: 1.087 a 1.095, 2004.
- Sood et al., Cancer Biology & Therapy, 1: 511 a 517, 2002.
- Sorensen et al., J. Mol. Biol. 327: 761 a 766, 2003.
- Soutschek et al., Nature, 432: 173 a 178, 2004.
- Spagnou et al., Biochemistry, 43: 13.348 a 13.356, 2004.
- Sulman et al., Genomics, 40: 371 a 374, 1997.
- Szoka e Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4.194 a 4.198, 1978.
- Thaker et al., 36^a Reunião Anual da Sociedade de Oncologistas Ginecológicos, Miami, Flórida, 2005.
- Thaker et al., Clin. Cancer Res., 10: 5.145 a 5.150, 2004.

- Thurston et al., *J. Clin. Invest.*, 101 (7): 1.401 a 1.413, 1998.
- Uchida et al., *Mol. Ther.*, 10: 162 a 171, 2004.
- Voskoglou-Nomikos et al., *Clin. Cancer Res.*, 9: 4.227 a 4.239, 2003.
- Walker-Daniels et al., *Prostate*, 41: 275 a 280, 1999.
- Wianny et al., *Nat. Cell Biol.*, 2: 70 a 75, 2000.
- Wong et al., *Gene*, 10: 87 a 94, 1980.
- Wu et al., *J. Hematol. Oncol.*, 4: 31, 2011.
- Xia et al., *Nat. Biotechnol.*, 20: 1.006 a 1.010, 2002.
- Yang et al., *Oncogene*, 22: 5.694 a 5.701, 2003.
- Zelinski et al., *Cancer Res.*, 61: 2.301, 2001.
- Zhang et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 10.677 a 10.684, 2004.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição CARACTERIZADA pelo fato de que compreende uma população de oligonucleotídeos, em que os oligonucleotídeos hibridizam com um produto de gene polinucleotídeo *STAT3*, em que os oligonucleotídeos da população são compostos de moléculas de nucleosídeos ligadas em conjunto através de ligações principais de fosfato, em que pelo menos uma das ligações principais de fosfato em cada o oligonucleotídeo é uma ligação principal P-etóxi, e em que não mais que 80% das ligações principais de fosfato em cada oligonucleotídeo são ligações principais P-etóxi.
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4.
3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, CARACTERIZADA pelo fato de que oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 1.
4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, CARACTERIZADA pelo fato de que oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 2.
5. Composição, de acordo com a reivindicação 2, CARACTERIZADA pelo fato de que oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 3.
6. Composição, de acordo com a reivindicação 2, CARACTERIZADA pelo fato de que oligonucleotídeos da população compreendem uma sequência de acordo com a SEQ ID NO: 4.
7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo

fato de que 50% a 80% das ligações principais de fosfato são ligações principais P-etóxi.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, CARACTERIZADA pelo fato de que 60% a 75% das ligações principais de fosfato são ligações principais P-etóxi.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que 20% a 50% das ligações principais de fosfato são ligações principais de fosfodiéster.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, CARACTERIZADA pelo fato de que 25% a 40% das ligações principais de fosfato são ligações principais de fosfodiéster.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que as ligações principais de fosfodiéster são distribuídas ao longo de cada oligonucleotídeo.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que as ligações principais de fosfodiéster não estão agrupadas dentro de uma porção de cada oligonucleotídeo.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que a população de oligonucleotídeos é heterogênea quanto ao número de ligações principais P-etóxi e ligações principais de fosfodiéster presentes nos oligonucleotídeos da população.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que os oligonucleotídeos da população têm um tamanho que varia de 18 a 30 nucleotídeos.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, CARACTERIZADA pelo

fato de que os oligonucleotídeos da população têm um tamanho médio de 18 nucleotídeos, em que não mais do que 14 das ligações principais de fosfato em cada oligonucleotídeo é uma ligação principal P-etóxi.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 14, CARACTERIZADA pelo fato de que os oligonucleotídeos da população têm um tamanho médio de 20 nucleotídeos, em que não mais do que 16 dentre as ligações principais de fosfato em cada oligonucleotídeo é uma ligação principal P-etóxi.

17. Composição, de acordo com a reivindicação 14, CARACTERIZADA pelo fato de que os oligonucleotídeos da população têm um tamanho médio de 25 nucleotídeos, em que não mais do que 20 dentre as ligações principais de fosfato em cada oligonucleotídeo é uma ligação principal P-etóxi.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 14, CARACTERIZADA pelo fato de que os oligonucleotídeos da população têm um tamanho médio de 30 nucleotídeos, em que não mais do que 24 dentre as ligações principais de fosfato em cada oligonucleotídeo é uma ligação principal P-etóxi.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que a população de oligonucleotídeos comprehende uma única espécie de oligonucleotídeos.

20. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que a população de oligonucleotídeos comprehende pelo menos duas espécies de oligonucleotídeos.

21. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que a população de oligonucleotídeos é heterogênea quanto à distribuição das ligações principais de fosfodiéster entre os oligonucleotídeos da população.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo

fato de que os oligonucleotídeos da população inibem a expressão da proteína STAT3.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que compreende ainda fosfolipídios e em que os oligonucleotídeos e fosfolipídios formam um complexo oligonucleotídeo-lipídico.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 23, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios não são carregados ou têm carga neutra no pH fisiológico.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios são fosfolipídios neutros.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios neutros são fosfatidilcolinas.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 25, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios neutros são dioleoilfosfatidilcolina.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 23, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios são essencialmente livres de colesterol.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 23, CARACTERIZADA pelo fato de que os fosfolipídios e oligonucleotídeos estão presentes em uma razão molar de cerca de 5:1 a cerca de 100:1.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 23, CARACTERIZADA pelo fato de que o complexo oligonucleotídeo-lipídeo é ainda definido como uma população de lipossomos.

31. Composição, de acordo com a reivindicação 30, CARACTERIZADA pelo fato de que pelo menos 90% dos lipossomas têm menos de 5 mícrons de diâmetro.

32. Composição, de acordo com a reivindicação 30, CARACTERIZADA pelo

fato de que a população de oligonucleotídeos é incorporada na população de lipossomos.

33. Composição, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADA pelo fato de que a composição é liofilizada.

34. Método para reduzir o nível de expressão da proteína STAT3 em uma célula caracterizado pelo fato de que compreende o contato da célula com uma composição, de acordo com a reivindicação 1.

35. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de que compreende uma composição, de acordo com a reivindicação 23, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

36. Composição, de acordo com a reivindicação 35, CARACTERIZADA pelo fato de que compreende ainda um agente quimioterapêutico.

37. Método de tratamento de um sujeito com câncer ou uma doença autoimune CARACTERIZADO pelo fato de que compreende administrar ao sujeito uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 35.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que o sujeito é um ser humano.

39. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que o câncer é um câncer de pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma de pâncreas, câncer de mama, câncer de próstata, melanoma, câncer de cólon, leucemia, linfoma, glioblastoma, osteossarcoma, câncer de cavidade oral, câncer de ovário, câncer uterino, câncer ósseo, câncer cerebral, câncer de próstata, câncer de rim, câncer de estômago, câncer de esôfago, câncer de reto, câncer de bexiga, câncer de testículo ou câncer de fígado.

40. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que a doença autoimune é lúpus eritematoso, espondiloartropatia, doença de Sjogren, doença de Crohn, diabetes mellitus, esclerose múltipla ou artrite reumatoide.

41. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que a composição é administrada por via subcutânea, intravenosa ou intraperitoneal.

42. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que compreende ainda a administração de pelo menos uma segunda terapia anticâncer ao sujeito.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, CARACTERIZADO pelo fato de que a segunda terapia anticâncer é uma terapia cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, terapia hormonal, imunoterapia, terapia antiviral, terapia de supressão imunológica, terapia antibacteriana, terapia antiparasitária, terapia antifúngica ou terapia com citocinas.

44. Método, de acordo com a reivindicação 37, CARACTERIZADO pelo fato de que a administração da composição reduz a expressão da proteína STAT3 no paciente.

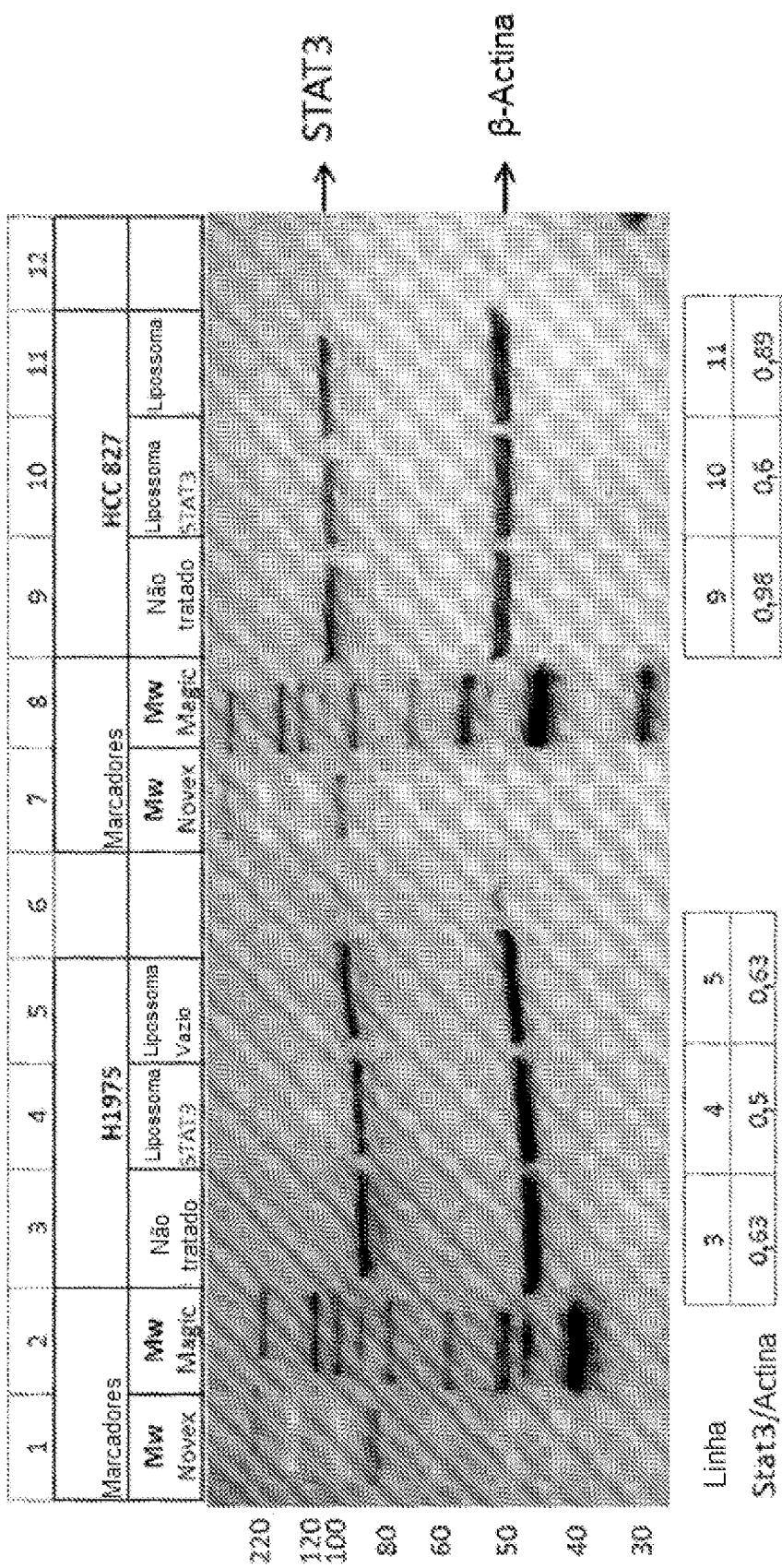


FIG. 1

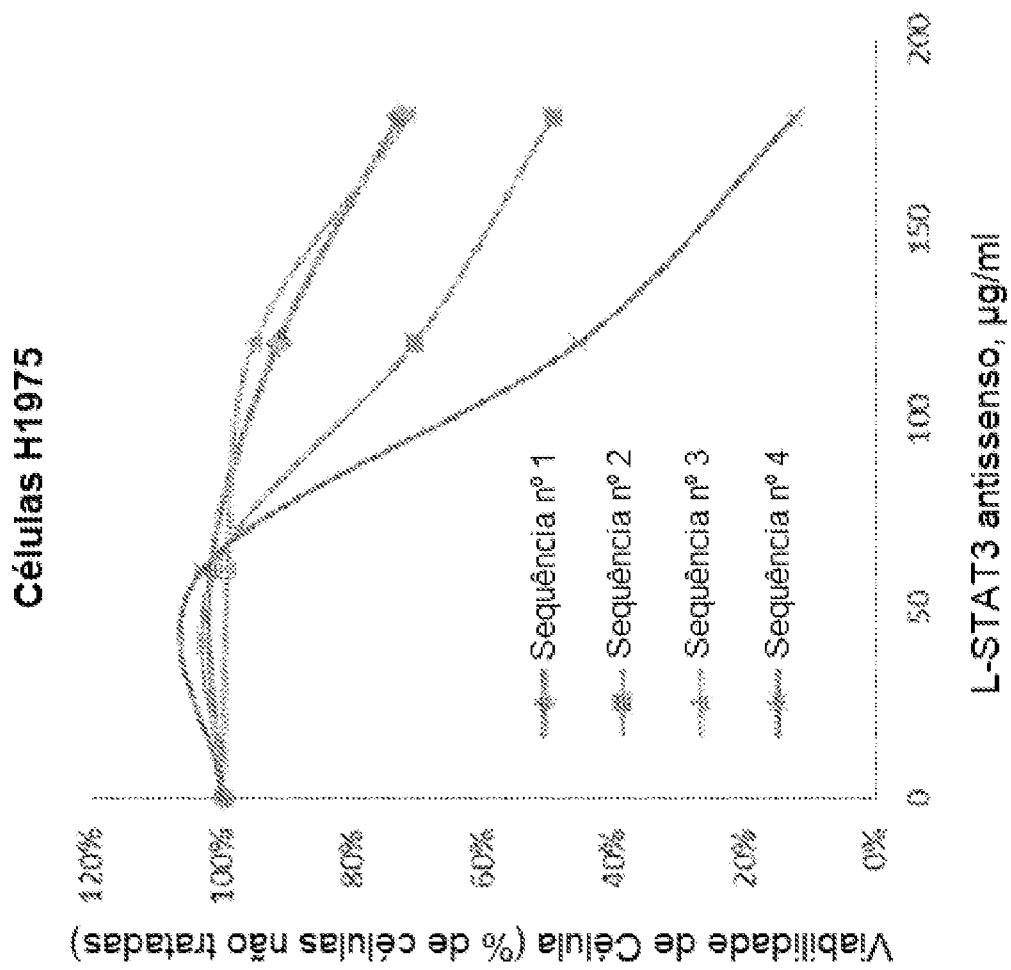


FIG. 2A

Células HCC827

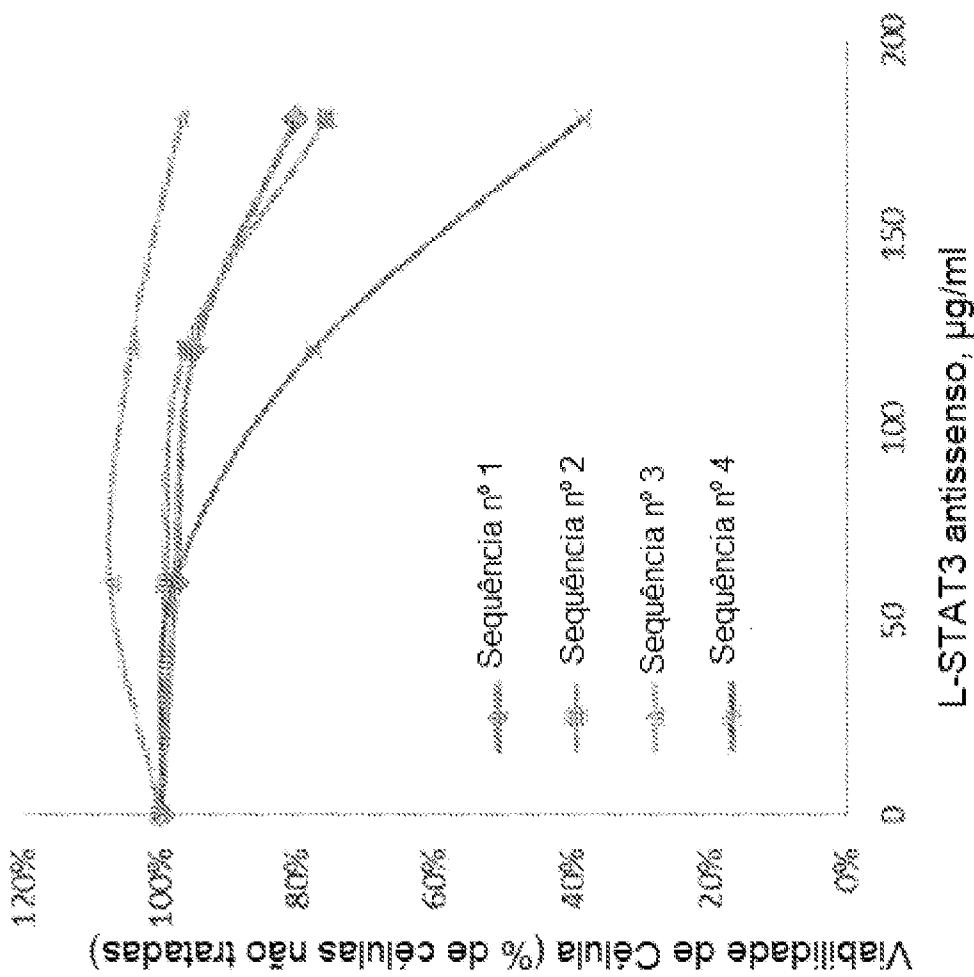


FIG. 2B

Células H358

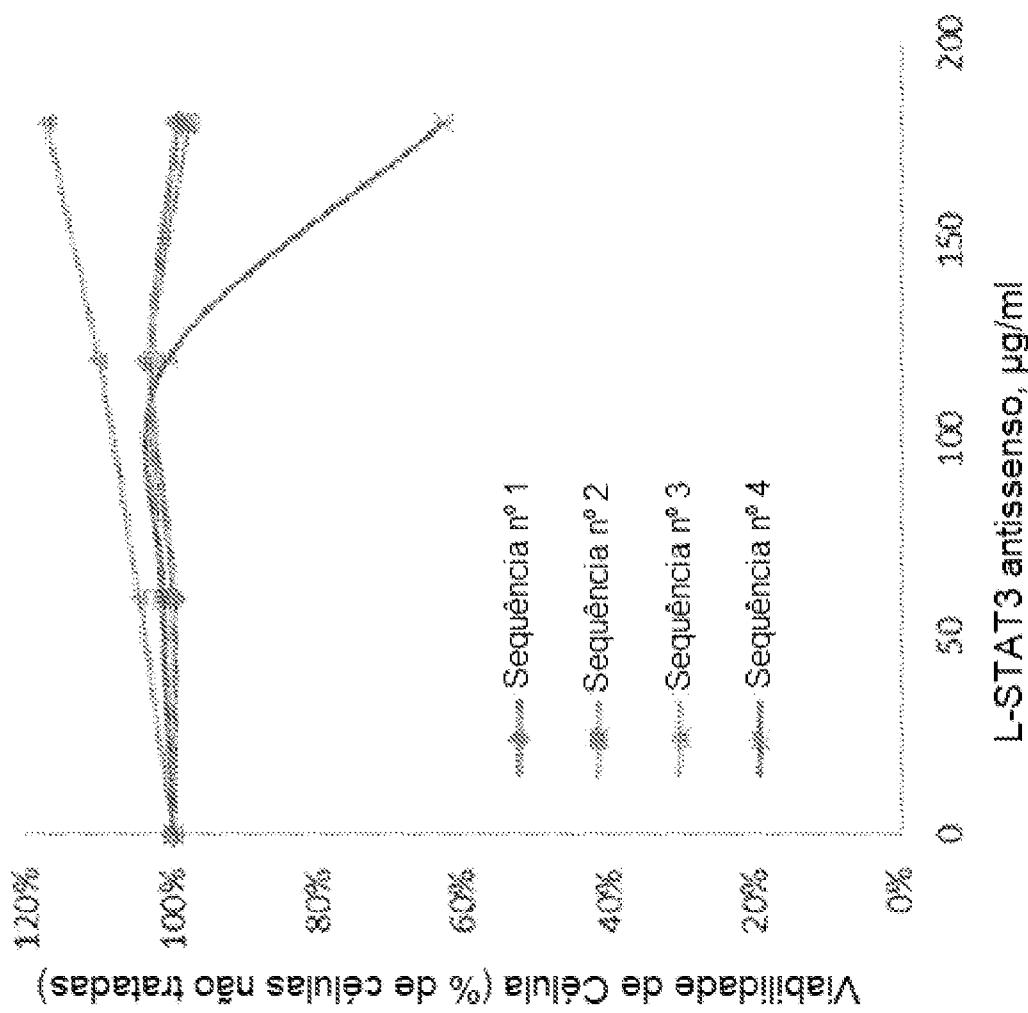


FIG. 2C

STAT3 anfisseno lipossomial inibe crescimento de linhas de células de leucemia

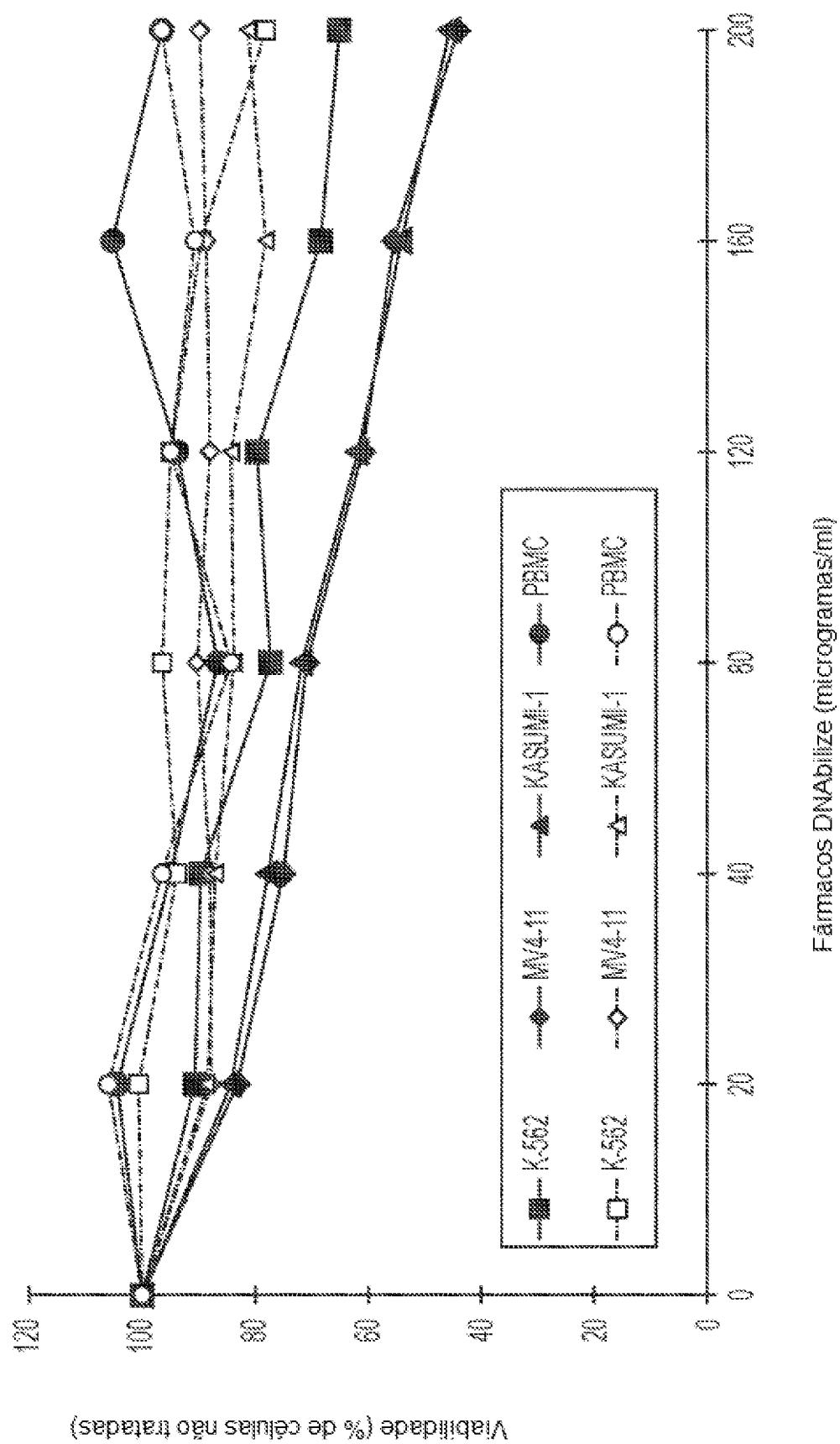


FIG. 3A

Fármacos DNAAbilize (microgramas/ml)

STAT3 antisenso lipossomial inibe crescimento de linhas de células de linfoma

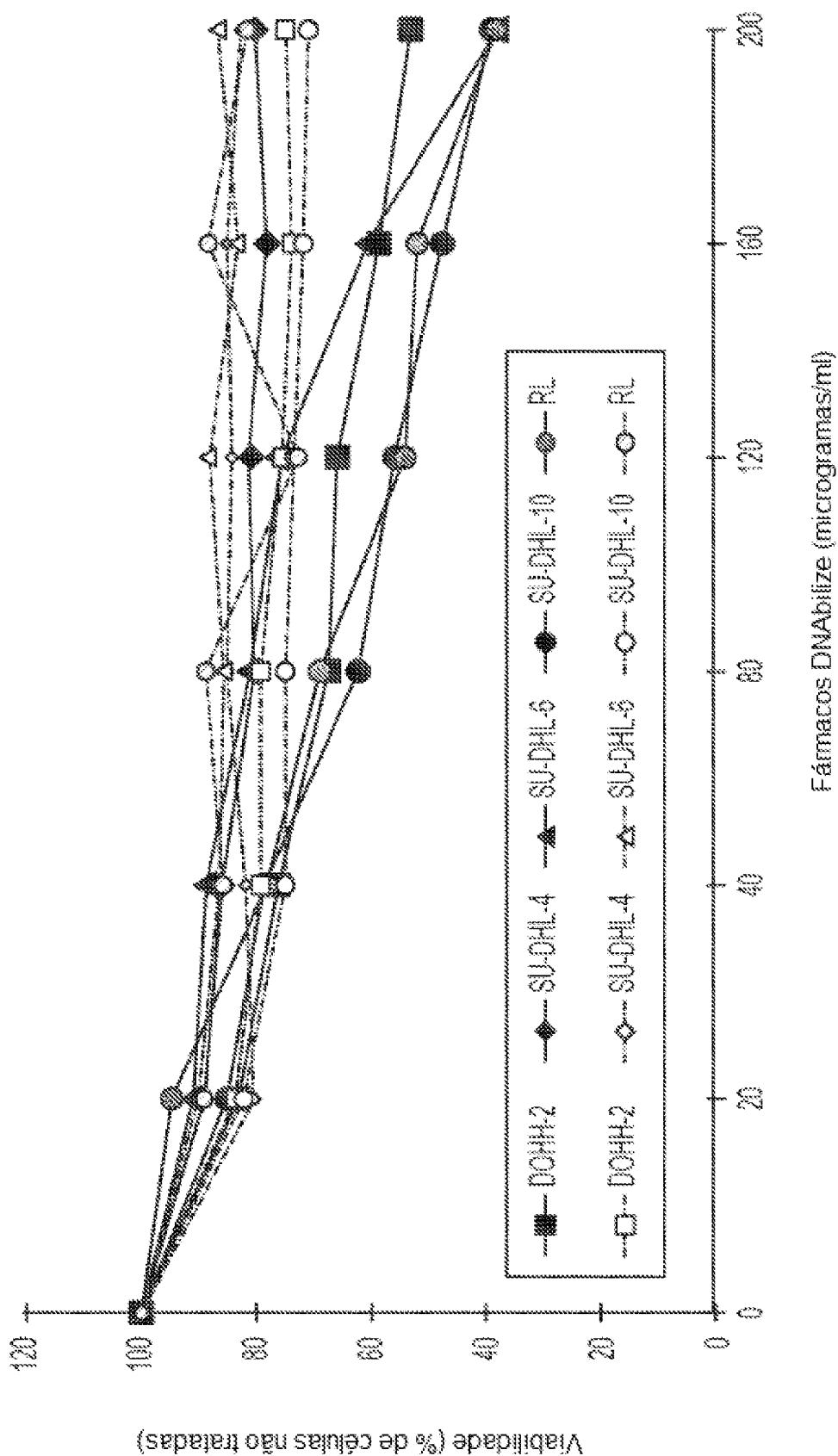


FIG. 3B

RESUMO

"ÁCIDOS NUCLEICOS P-ETÓXI PARA INIBIÇÃO DE STAT3"

Trata-se de sistemas de distribuição aprimorados para oligonucleotídeos, sendo que o dito sistema de distribuição compreende um lipossomo que compreende fosfolipídios neutros e um P-etoxy-oligonucleotídeo, que tem como alvo um polinucleotídeo codificador de STAT3. Métodos de tratamento de pacientes com os ditos sistemas de distribuição também são fornecidos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: listagemsequencia.txt
- Data de Geração do Código: 12/12/2019
- Hora de Geração do Código: 16:45:37
- Código de Controle:
 - Campo 1: A45CECFBAAF771EB
 - Campo 2: 6E6566EFB1791F4F