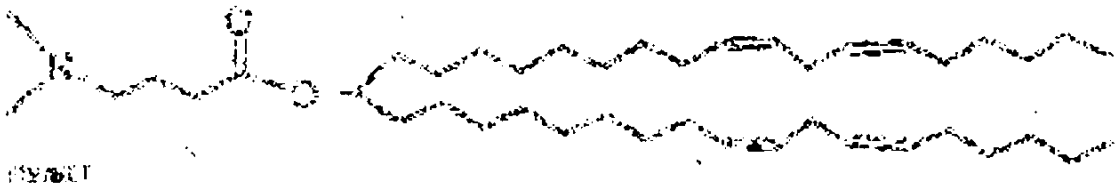
ÖZET

GELİŞTİRİLMİŞ LİPİT FORMULASYONU

Buluş, lipit partikülleri kullanılarak terapötik ajanın verilmesi alanı ile ilgilidir. Özellikle, mevcut buluş spesifik bir katyonik lipit ile, bunun bir terapötik ajanın bir hücreye verilmesindeki kullanımları ile ve bahsedilen katyonik lipidi içeren lipit formülasyonları ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Katyonik bir lipid olup, özelliği; formül I'e sahip olması:



ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu olmasıdır.

2. İstem 1'in katyonik lipidi olup, özelliği; bir terapötik ajanın, bir hücreye verilmesinde kullanım için olmasıdır.

3. Bir lipit formülasyonu olup, özelliği; istem 1'in bir katyonik lipidini içermesidir.

4. İstem 3'ün lipit formülasyonu olup, özelliği; ayrıca bir terapötik ajan içermesi, burada terapötik ajanın bir nükleik asit içermesidir.

5. İstem 4'ün lipit formülasyonu olup, özelliği; nükleik asidin bir siRNA, bir mikroRNA, bir antagomir, bir mikroRNA inhibitörü, bir bağışıklık uyarıcı nükleik asit ya da bir U1 adaptöründen oluşan gruptan seçilmesidir.

6. İstem 3'ün lipit formülasyonu olup, özelliği; ayrıca en az bir apolipoprotein içermesidir.

7. İstem 4'ün lipit formülasyonu olup, özelliği; burada terapötik ajanın bir antisens, siRNA ya da ribozim olmasıdır.

TARİFNAME

GELİŞTİRİLMİŞ LİPİT FORMULASYONU

Buluş, lipit partikülleri kullanılarak terapötik ajanın verilmesi alanı ile ilgilidir. Özellikle, mevcut buluş spesifik bir katyonik lipit ile, bunun bir terapötik ajanın bir hücreye verilmesindeki kullanımları ile ve bahsedilen katyonik lipidi içeren lipit formülasyonları ile ilgilidir.

Terapötik nükleik asitler, örneğin küçük etkileşimli RNA (siRNA), mikro RNA 10 (miRNA), antisens oligonükleotidler, ribozimler, plazmidler, immün stimüle edici nükleik asitler içerir. Bu nükleik asitler çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etki eder. siRNA veya miRNA durumunda, bu nükleik asitler, RNA interferansı (RNAi) olarak adlandırılan bir süreç boyunca belirli proteinlerin hücre içi seviyelerini aşağı regüle edebilir. siRNA ya da miRNA'nın hücre sitoplazması içerisine sokulmasının ardından, bu çift zincirli RNA yapıları, RISC olarak adlandırılan bir proteine bağlanabilir. siRNA ya da miRNA'nın sens zinciri, bağlanan siRNA veya miRNA'nın olanına tamamlayıcı bir sekans ile mRNA'yı tanıyabilen ve bağlayabilen RISC içerisinde bir şablon temin edilerek RISC kompleksinden yeri değiştirilir. Tamamlayıcı mRNA'yı bağlanmaya sahipken RISC kompleksi mRNA'yı ayırır ve ayrılmış zincirleri serbest bırakır. RNAi, protein sentezi için kodlayan karşılık gelen mRNA'nın spesifik yıkımını hedefleyerek spesifik proteinlerin aşağı regülasyonunu sağlayabilir.

RNAi'nin terapötik uygulamaları son derece geniştir, çünkü siRNA ve miRNA yapıları, bir hedef proteine karşı yönlendirilen herhangi bir nükleotid sekansı ile sentezlenebilir. Bugüne kadar, siRNA yapıları, hem in vitro hem de in vivo modellerde hedef proteinleri spesifik olarak aşağı regüle etme yeteneğini göstermiştir. Buna ilaveten, siRNA yapıları günümüzde klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir.

Buna rağmen, siRNA veya miRNA yapıları ile hali hazırda karşı karşıya kalınan iki problem, ilk olarak, plazmadaki nükleaz sindirimine olan duyarlılıklarıdır ve İkincisi, serbest siRNA veya miRNA olarak sistemik olarak uygulandıklarında RİSC'yi bağlayabildikleri yerdeki hücre ipi bölüme erişim kazanmak için sınırlı yetenekleridir. Bu çift zincirli yapılar, kimyasal olarak modifiye edilmiş nükleotid bağlayıcıların molekül içerisinde, örneğin fosfontioat gruplarının dahil edilmesiyle stabilize edilebilir. Buna rağmen, bu kimyasal modifikasyonlar sadece nükleaz sindiriminden sınırlı koruma sağlar ve yapının aktivitesini azaltabilir. siRNA ya da miRNA'nın hücre ipi verilişi,

örneğin, polimerler, katyonik lipozomlar gibi taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile ya da örneğin kolesterol moleküllerinin kovalent bağlanması yoluyla yapının kimyasal modifikasyonu ile kolaylaştırılabilir. Buna rağmen, siRNA ve miRNA moleküllerinin potansiyelini arttırmak ve kimyasal modifikasyon gereksinimini azaltmak veya elimine etmek için geliştirilmiş verilme sistemleri gerekmektedir.

Antisens oligonükleotidler ve ribozimler de aynı zamanda protein içerisine mRNA translasyonunu inhibe edebilir. Antisens yapıları durumunda, bu tek zincirli deoksinükleik asitler hedef protein mRNA'sının olanına tamamlayıcı bir sekansa sahiptir ve Watson- Crick baz eşlemesiyle mRNA'ya bağlanabilir. Bu bağlanma hem hedef mRNA'nın translasyonunu önler ve / veya mRNA transkriptlerinin RNaz H bozunmasını tetikler. Sonuç olarak, antisens oligonükleotidler, etkinin özgüllüğü (yani, spesifik bir hastalıkla- ilişkili proteinin aşağı regülasyonu) için muazzam bir potansiyele sahiptir. Günümüze kadar, bu bileşiklerin, çeşitli in vitro ve in vivo modellerde, enflamatuar hastalık, kanser ve HIV modelleri de dahil olmak üzere umut vaat ettiğini göstermektedir (Agrawal, Trends in Biotech. 14: 376- 387 (1996) sayılı belgede gözden geçirilmiştir). Antisens anı zamanda, spesifik olarak kromozomal DNA ile hibridize edilerek hücresel aktiviteyi de etkileyebilir. Çeşitli antisens ilaçların ileri insan klinik değerlendirmeleri hali hazırda devam etmektedir. Bu ilaçlar için hedefler, bcl2 ve apolipoprotein B genleri ve mRNA ürünlerini içerir.

İmmün stimüle edici nükleik asitler, deoksiribonükleik asitleri ve ribonükleik asitleri içerir. Deoksiribonükleik asitlerin durumunda, belirli sekanslar veya motiflerin memelilerde bağışıklık stimülasyonunu kural dışı olduğunu göstermiştir. Bu sekanslar veya motifler, CpG motif, pirimidimden zengin sekansları ve palindromik sekansları içerir. Deoksiribonükleik asitlerdeki CpG motifinin, daha sonra hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık stimülasyon yolunu tetikleyen bir endozomal reseptör, toll benzeri reseptör 9 (TLR- 9) tarafından spesifik olarak kabul edildiğine inanılmaktadır. Bazı bağışıklık stimüle edici ribonükleik asit sekansları da aynı zamanda rapor edilmiştir. Bu RNA sekanslarının, toll benzeri reseptörler 6 ve 7'ye (TLR- 6 ve TLR- 7) bağlanarak bağışıklık aktivasyonunu tetiklediğine inanılmaktadır. Buna ilaveten, çift zincirli RNA'nın da aynı zamanda immün stimüle edici olduğu rapor edilmektedir ve TLR- 3'e bağlanması aracılığıyla aktive olacağına inanılmaktadır. Terapötik nükleik asitlerin kullanımı ile ilgili iyi bilinen bir problem, fosfodiester nükleotit arası bağlantının dayanıklılığı ve bu bağlayıcının nükleazlara duyarlılığı ile ilgilidir. Serum içinde

ekzonükleazlar ve endonükleazların mevcudiyeti, fosfodiester bağlayıcılara sahip olan nükleik asitlerin hızlı sindirilmesine neden olur ve dolayısıyla, terapötik nükleik asitler serumun mevcudiyetinde ya da hücrelerin içerisinde çok kısa yarı ömürlere sahip olabilir (Zelphati, O., ve diğ, Antisense. Res. Dev. 3: 323- 338 (1993); ve Thierry, A.R., ve diğ, ppl47- 161 in Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA (Eds. Erickson, RJP and Izant, JG; Raven Press, NY (1992) sayılı belgeler). Günümüzde geliştirilmekte olan terapötik nükleik asit, bunlar ve diğer bilinen problemlerden dolayı doğal nükleik asitlerde bulunan temel fosfodiester kimyasını kullanmamaktadır.

Bu problemin üstesinden, serum veya hücre içi bozunmayı azaltan kimyasal modifikasyonlar ile kısmen gelinmiştir. Modifikasyonlar, internükleotid fosfodiester köprüsünde (örn., fosforotioat, metilfosfonat veya fosforamidat bağları kullanılarak), nükleotid bazında (örn., 5- propinil- pirimidinler) ya da şekerde (örn., 2'- modifiye edilmiş şekerler) test edilmiştir (Uhlmann E., ve diğ. Antisense: Chemical Modifikasyonlar. Encyclopedia of Cancer, Cilt. X., syf. 64- 81 Academic Press İne. (1997) sayılı belge). Diğerleri, 2'- 5' şeker bağlantılarını kullanarak stabilitesinin geliştirilmesini denemişlerdir (bkz., ör., U.S. Pat. No. 5,532,130 sayılı belge). Diğer değişiklikler denenmiştir. Bununla birlikte, bu çözeltilerin hiçbirinin tamamen tatmin edici olmadığı kanıtlanmıştır ve in vivo olarak serbest terapötik nükleik asitler halen sadece sınırlı etkinliğe sahiptir.

Buna ilaveten, yukarıda siRNA ve miRNA ile ilgili olarak belirtildiği gibi, problemler terapötik nükleik asitlerin çapraz hücresel zarlara olan sınırlı kabiliyeti ile kalır (bakınız, Vlassov ve diğ., Biochim. Biophys. Açta 1197: 95- 1082 (1994) sayılı belge) ve kompleman- aracılı anafilaksi, değiştirilmiş koagülatör özellikleri ve sitopeni gibi sistemik toksisite ile ilgili problemlerde kalır (Galbraith ve diğerleri, Antisense Nucl. Acid Drug Des. 4: 201- 206 (1994) sayılı belge).

Etkinliği arttırmaya çalışmak için, buluş sahipleri aynı zamanda kimyasal olarak modifiye edilmiş ya da modifiye edilmemiş terapötik nükleik asitleri vermek için lipit bazlı taşıyıcı sistemler de kullanmışlardır. Zelphati, O ve Szoka, F.C., (J. Contr. Rel. 41: 99- 1 19 (1996)) belgesinde, yazarlar anyonik (konvansiyonel) lipozomlar, pH'ye duyarlı lipozomlar, immünolipozomlar, füzojenik lipozomlar ve katyonik lipit / antisens agregatlarının kullanılmasına işaret ederler. Benzer bir şekilde siRNA sistemik olarak, katyonik lipozomlarda tatbik edilmiştir ve bu nükleik asit- lipit partikülleri, insan olmayan primatlar dahil olmak üzere memelilerde hedef proteinlerin geliştirilmiş aşağı

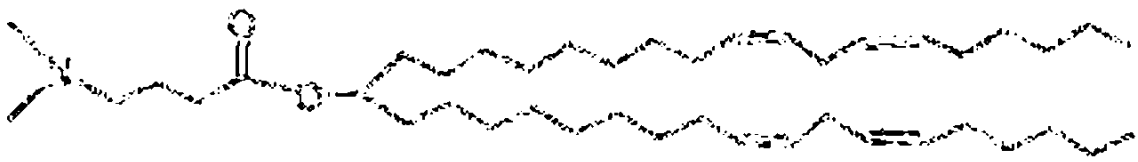
regülasyonu sağladığı bildirilmiştir (Zimmermann ve diğ., Nature 441: 111- 114 (2006) sayılı belge).

Bu bağlamda, US2009 / 0023673 A1 sayılı belge, örneğin lipozomlar ve lipopleksler gibi nükleik asit tabanlı tedavilerin uygulanmasında faydalı kompozisyonları ve yöntemleri tarif etmektedir. Ayrıca, US 2003 / 0229038 A1 belgesi, biyolojik olarak aktif moleküllerin hücrelerin içine taşınmasını kolaylaştırmaya yönelik bir katyonik amfifili açıklamaktadır, bahsedilen amfifil bir lipit çapası, bir aralayıcı grup ve bir başlık grubu içerir.

Son gelişmelere rağmen, genel terapötik kullanım için uygun olan gelişmiş lipit – terapötik nükleik asit kompozisyonları açısından teknik alanda bir ihtiyaç devam etmektedir. Tercih edilen şekliyle, bu kompozisyonlar yüksek verimliliğe sahip nükleik asitleri içerecek, yüksek ilaç : lipit oranlarına sahip olacak, kapsüllenmiş nükleik asidi parçalanmaya karşı ve serum içinden atılımına karşı koruyacak, sistemik dağıtım için uygun olacak ve kapsüllenmiş nükleik asidin hücre içi dağıtımını sağlayacaktır. Ek olarak, bu lipit – nükleik asit partikülleri, hastanın, nükleik asidin etkili bir dozu ile tedavisi önemli bir toksisite ve / veya hasta için risk ile ilişkili olmayacak şekilde iyi tolere edilmeli ve yeterli bir terapötik indeks sağlamalıdır. Mevcut buluş, bu tip kompozisyonlar sağlamaktadır. Ayrıca, bu kompozisyonları yapmaya yönelik yöntemler ve hastalıkların tedavisi de dahil olmak üzere nükleik asitleri hücrelere vermek için bu kompozisyonların kullanım yöntemleri de burada tarif edilmektedir.

Mevcut buluş aşağıdaki maddeler ile ilgilidir:

1. Formül I'in:



Formül I

bir katyonik lipit formülü ya da bunun farmasötik olarak kabul edilebilen bir tuzu.

2. Bir terapötik ajanın bir hücreye verilmesinde kullanım için olan İstem 1'e ait katyonik lipit.

3. İstem 1'e ait bir katyonik lipidi içeren bir lipit formülasyonu.

4. Ayrıca, bir terapötik ajan içeren istem 3'e ait lipit formülasyonu olup, burada bahsedilen terapötik ajan bir nükleik asit içerir.

5. İstem 4'e ait lipit formülasyonu olup, burada nükleik asit bir siRNA, bir mikroRNA, bir antagomir, bir mikroRNA inhibitörü, bir bağışıklığı uyaran nükleik asit ya da bir U1 adaptöründen oluşan gruptan seçilir.

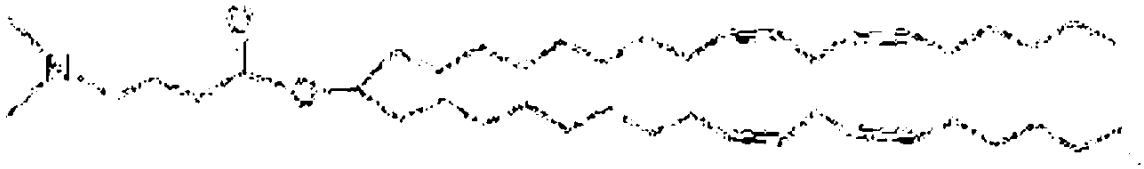
6. Ayrıca, en az bir apolipoprotein içeren istem 3'e ait lipit formülasyonu.

7. İstem 4'e ait lipit formülasyonu olup, burada terapötik ajan bir antisens, siRNA ya da ribozimdir.

Mevcut buluş, yeni katyonik lipitlerin yanı sıra bunları içeren lipit partikülleri de sunar. Bu lipit partikülleri ayrıca aktif bir ajan içerebilir ve bu aktif ajanın bir hücreye verilmesi için buluşa ait ilgili yöntemlere göre kullanılabilir.

Bu buluşun lipidi, bir ya da daha fazla izomerik yapılar içerebilir. Bu bileşiğin tüm bu izomerik yapıları, mevcut buluşta bilhassa ihtiva edilmektedir. Bu buluşa ait bileşik ayrıca bağlar (örn., karbon – karbon bağları) ya da mesela, bir çift bağın varlığından kaynaklanan sınırlama gibi bağ dönüşünü sınırlayan ikameler içerebilir. Bu doğrultuda, tüm cis / trans ve E / Z izomerleri bilhassa mevcut buluş dahilindedir.

Bir yaklaşımda, buluş formül I'in bir katyonik lipidini içeren gelişmiş lipit formülasyonları sağlamakta olup, burada formül I aşağıdaki gibidir:



Formül I ayrıca DLin- M- C3- DMA, MC3 ya da M- C3 olarak da ifade edilebilir. Formül I, DLin- M- C3- DMA, MC3 ve M- C3'ten her biri doğrudan yukarıda sunulan formüle sahiptir.

Lipit formülasyonları tipik olarak bir nötr lipit, bir sterol ve bir PEG ya da PEG ile değiştirilmiş lipit de içerir.

Bir yaklaşımda, gelişmiş lipit formülasyonu ayrıca bir hedefleme lipidi (örn., bir Ga1Nac ve / veya folat içeren lipit) içerir.

Burada, gelişmiş lipit formülasyonlarının bir ekstrüzyon ya da bir aynı eksende karıştırma yöntemi vasıtası ile hazırlanması tarif edilmektedir.

Burada, RNA tabanlı yapıyı içeren gelişmiş lipit formülasyonlarının bir hayvana uygulanması ve hedef genin ekspresyonunun değerlendirilmesine dair bir yöntem tarif edilmektedir.

Bir yaklaşımda, buluşta öne çıkan bir lipit formülasyonu, örneğin, bir çift sarmallı RNA (dsRNA) gibi bir oligonükleotit ile kompleks hale getirilen bir lipit formülasyonu, in vivo ya da in vitro olarak bir tümör hücresindeki hedef gen ekspresyonunu değiştirmek (örn., azaltmak) için kullanılabilir. Bazı düzenlemelerde, buluşta öne çıkan bir lipit formülasyonu HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87 ve PC3 hücre dizilerini içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan bir tümör hücresi dizisindeki hedef gen ekspresyonunu değiştirmek için kullanılabilir.

Burada, mevcut buluşun lipidini içeren bir lipit partikülü açıklanmaktadır. Belirli düzenlemelerde, lipit partikülü ayrıca bir nötr lipit ve partikül toplanmasını azaltabilen bir lipit de içerir. Bir düzenlemede, lipit partikülü esas olarak (i) mevcut buluşun en az bir lipidinden; (ii) DSPC, DPPC, POPC, DOPE ve SM'den seçilen bir nört lipidden; (iii) örneğin, kolestrol gibi sterolden ve (iv) yaklaşık % 20- 60 katyonik lipit : % 5- 25 nötr lipit : % 25- 55 sterol; % 0.5- 15 PEG –lipit olan bir molar oranda, örneğin PEG- DMG ya da PEG- cDMA gibi peg- lipidden oluşur. Bir düzenlemede, mevcut buluşa ait lipit optik olarak saftır.

İlgili ek düzenlemelerde, burada açıklanan lipit partikülleri ayrıca terapötik ajan içermektedir. Bir düzenlemede, terapötik ajan bir nükleik asittir. Bir düzenlemede, nükleik asit bir plazmit, bir bağışıklığı uyarıcı oligonükleotit, bir tek sarmallı oligonükleotit, örn. bir antisens oligonükleotit, bir antagomir; bir çift sarmallı oligonükleotit, örn., bir siRNA; bir aptamer ya da bir ribozimdir.

Yine, ilgili bir başka düzenlemede, burada açıklanan bir farmasötik kompozisyon olup, burada tarif edilen bir lipidi ve farmasötik olarak kabul edilebilen bir katkı maddesini, seyrelticinin taşıyıcısını içerir.

İlgili diğer düzenlemelerde, burada, bir hücredeki bir hedef genin ekspresyonunu modüle etmeye dair bir yöntem açıklanmakta, bu yöntem burada tarif edilen bir lipidin ya da farmasötik kompozisyonun bir hücreye sağlanmasını içermektedir. Hedef gen, vahşi tipte bir gen olabilir. Bir başka düzenlemede, hedef gen bir ya da daha fazla mutasyon içerir. Özel bir düzenlemede, yöntem bir ya da daha fazla mutasyon içeren bir hedef genin ekspresyonunu spesifik olarak değiştirmeyi içerir. Özel

düzenlemelerde, lipit partikülü bir bağışıklığı uyarıcı oligonükleotit, bir tek sarmallı oligonükleotit, örn. bir antisens oligonükleotit, bir antagomir; bir çift sarmallı oligonükleotit, örn., bir siRNA; bir aptamer, bir ribozimden seçilen bir terapötik ajan içerir. Bir düzenlemede, nükleik asit bir SiRNA'yı, bir antisens oligonükleotidi, bir aptameri ya da bir ribozimi kodlayan plazmittir.

Bir yaklaşımda, hedef gen Faktör VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF beta geni, Erb- B geni, Src geni, CRK geni, GRB2 geni, RAS geni, MEKK geni, JNK geni, RAF geni, Erkl / 2 geni, PCNA (p21) geni, MYB geni, JUN geni, FOS geni, BCL- 2 geni, Siklin D geni, VEGF geni, EGFR geni, Siklin A geni, Siklin E geni, WNT-I geni, beta- katenin geni, c- MET geni, PKC geni, NFKB geni, STAT3 geni, survivin geni, Her2 / Neu geni, topoizomeraz I geni, topoizomeraz II alfa geni, p73 geni, p21 (WAF1I / CIP1) geni, p27 (KIP1) geni, PPM1D geni, RAS geni, kaveolin I geni, MIB I geni, MTAI geni, M68 geni, SORTI geni, XBP1 geni, tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar, p53 tümör baskılayıcı gen ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilir.

Bir başka düzenlemede, nükleik asit, polipeptidin ya da bunun fonksiyonel varyantının ya da fragmanının ekspresyonunu arttıracak şekilde bir polipeptidi ya da bunun bir fonksiyonel varyantını ya da fragmanını kodlayan bir plazmittir.

Yine, ilgili bir diğer düzenlemede, burada, bir denekteki bir polipeptidin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen bir hastalığın ya da rahatsızlığın tedavi edilmesine dair, burada açıklanan bir lipit partikülünün ya da farmasötik kompozisyonun bir deneğe verilmesini içeren bir yöntem açıklanmakta olup, bu terapötik ajan bir siRNA, bir mikroRNA, bir antisens oligonükleotit ve bir siRNA, bir mikroRNA ya da bir antisens oligonükleotit eksprese edebilen bir plazmitten seçilir ve siRNA, mikroRNA ya da antisens RNA polipeptidi ya da bunun bir komplementini kodlayan bir polinükleotide spesifik olarak bağlanan bir polinükleotidi içerir.

İlgili bir başka düzenlemede, burada açıklanan, bir denekte bir polipeptidin az eksprese edilmesi ile karakterize edilen bir hastalığın ya da bir rahatsızlığın tedavi edilmesine dair bir yöntem olup, bahsedilen deneğe burada açıklanan farmasötik kompozisyonun verilmesini içerir, burada terapötik ajan, polipeptidi ya da bunun bir fonksiyonel varyantını ya da fragmanını kodlayan bir plazmittir.

Bir diğer düzenlemede, burada açıklanan bir denekteki bir bağışıklık tepkisini indükleyen bir yöntem olup, burada açıklanan bir farmasötik kompozisyonun bahsedilen deneğe verilmesini içerir, burada terapötik ajan bir bağışıklığı uyarıcı oligonükleotittir. Özel düzenlemelerde, farmasötik kompozisyon hastaya bir aşı ya da antijen ile birlikte sağlanır.

İlgili bir düzenlemede, burada açıklanan, burada tarif edilen lipidi içeren bir aşı ya da ve hastalık ya da patojen ile ilişkili bir antijendir. Bir düzenlemede, lipit partikülü, bir bağışıklığı uyarıcı nükleik asit ya da oligonükleotittir. Özel bir düzenlemede, antijen, bir tümör antijenidir. Bir başka düzenlemede, antijen bir viral antijen, bir bakteriyel antijen ya da bir parasitik antijendir.

Burada ayrıca, lipit partiküllerini ve burada tarif edilen farmasötik kompozisyonların yanı sıra bu lipit partiküllerini ve farmasötik kompozisyonların hazırlanması için faydalı kitlerin hazırlanmasına dair yöntemler açıklanmaktadır.

Bir başka düzenlemede, burada bir ajan, örneğin bir terapötik ajan ya da bir diagnostik ajan ve mevcut buluşun bir lipidini içeren bir kompozisyonun değerlendirilmesine dair bir yöntem açıklanmaktadır.

Şekiller şunları gösterir:

ŞEKİL 1, bir fare modelinde, DLin- M- C3- DMA içeren lipit formülasyonların FVII'nin baskılanması üzerindeki etkisini gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 2, sıçanlarda MC3 doz tepkisini, çeşitli lipozomal kompozisyonlarla gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 3, MC3'ü içeren formülasyonların etkinliğinin ApoE bağımlılığını gösteren bir çubuk grafiktir. Vahşi tip olan, ancak ApoE olmayan nakavt (gen ifadesi durdurulmuş) fareler, FVII protein seviyelerinde doza bağlı azalma göstermiştir. ŞEKİL 2 ayrıca, MC3 lipozomal formülasyonunun ApoE bağımlılığının ve MC3 kullanan ApoE KO farelerinde baskılama eksikliğinin, önceden ApoE ile karıştırılarak etkin bir şekilde kurtarılabildiğini kanıtlamaktadır.

ŞEKİL 4, bir lipozomal formülasyonda, MC3'ün mol yüzdesindeki değişikliklerin etkilerini ve nötr lipiddeki varyasyonların etkilerini (örn., nötr lipidi DSPC, DMPC ve DLPC ile farklılaştırmak gibi) gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 5, artan PEG- perdelemenin, farelerde Ga1NAc aracılı olmayan baskılamayı azalttığını gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 6, artan PEG- perdelemenin, sıçanlarda Ga1NAc aracılı olmayan baskılamayı azalttığını gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 7, Ga1NAc içeren ya da içermeyen, MC3'ün farklı mol yüzdesine (%) sahip lipozomal formülasyonlarının etkinliğini gösteren bir çubuk grafiktir.

ŞEKİL 8, Ga1NAc ile hedeflenen lipozomların aktivitesinin, Asyaloglikoprotein Reseptör (ASGPR) nakavt farelerinde ortadan kaldırıldığını gösteren bir çubuk grafiktir.

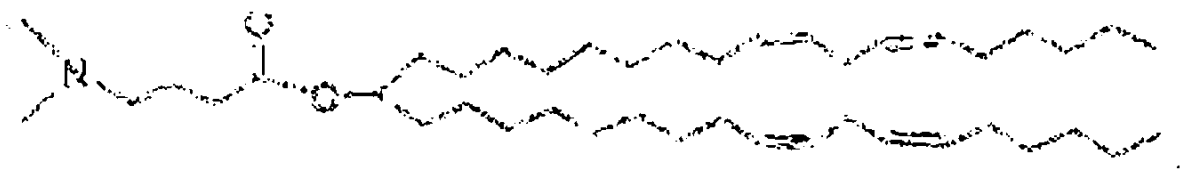
ŞEKİL 9, Örnek 17'de hazırlanan formülasyon için kalıntı FVII yüzdesi (%) ve dozun (mg / kg) bir doz tepkisi eğrisidir.

ŞEKİL 10, Örnek 18'de belirlendiği gibi formül I'e ait bir katyonik lipidin pKa titrasyon eğrisidir.

Burada, örneğin, bir RNA- tabanlı yapı gibi bir nükleik asit tabanlı ajan benzeri bir ajanı bir hücreye ya da deneğe verecek şekilde kullanılabilen gelişmiş bir lipit formülasyonu açıklanmaktadır. Burada ayrıca RNA- tabanlı bir yapı içeren gelişmiş lipit formülasyonlarını bir hayvana uygulamaya ve bazı düzenlemelerde, hedef genin ekspresyonunu değerlendirmeye dair yöntemler de tarif edilmektedir. Bazı düzenlemelerde, gelişmiş lipit formülasyonu bir hedefleme lipidi (örn., bir Ga1NAc ya da folat içeren lipit gibi burada tarif edilen bir hedefleme lipidi) içerir.

LİPİTLER

Burada açıklananlar, aşağıdaki formül I'in bir katyonik lipidini, bir nötr lipit, bir sterol ve bir PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içeren gelişmiş lipit formülasyonları olup, burada formül I aşağıdaki gibidir.



Bir düzenlemede, lipit bir rasemik karışımdır.

Bir düzenlemede, lipit bir diastereomer içinde zenginleştirilir, örneğin, lipit en az % 95, en az % 90, en az % 80 ya da en az % 70 diastereomerik aşırılaştırmaya sahiptir.

Bir düzenlemede, lipit kiral olarak saftır, örneğin, tek bir izomerdir.

Bir düzenlemede, lipit bir izomer için zenginleştirilir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar en az % 75, en az % 80 ya da en az % 90 tarafından tutulur. Bir düzenlemede, formülasyon formül I'in katyonik lipidini molar bazda yaklaşık % 25 ila yaklaşık % 75, örneğin, molar bazda yaklaşık % 35 ila yaklaşık % 65, yaklaşık % 45 ila yaklaşık % 65, yaklaşık % 60, yaklaşık % 57.5, yaklaşık % 50 ya da yaklaşık % 40 içerir.

Bir düzenlemede, bu formülasyon nötr lipidini molar bazda yaklaşık % 0.5 ila yaklaşık % 15 arasında, örneğin, molar bazda yaklaşık % 3 ila yaklaşık % 12, yaklaşık % 5 ila yaklaşık % 10 arasında ya da yaklaşık % 15, yaklaşık % 10 ya da yaklaşık % 7.5 içerir.

Bir düzenlemede, formülasyon sterolü, molar bazda yaklaşık % 5 ila yaklaşık % 50 arasında, örneğin, molar bazda yaklaşık % 15 ila yaklaşık % 45, yaklaşık % 20 ila % 40 arasında, yaklaşık % 40, yaklaşık % 38.5, yaklaşık % 35 ya da yaklaşık % 31 oranında içerir. Bir düzenlemede bahsedilen sterol, kolesteroldür.

Bir düzenlemede, formülasyon PEG'i ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipidi molar bazda yaklaşık % 0.5 ila yaklaşık % 20 arasında, örneğin, molar bazda yaklaşık % 0.5 ila yaklaşık % 10, yaklaşık % 0.5 ila yaklaşık % 5 arasında, yaklaşık % 1.5, yaklaşık % 0.5, yaklaşık % 1.5, yaklaşık % 3.5 ya da yaklaşık % 5 oranında içerir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda % 25- 75 formül I'in katyonik lipidini, % 0.5- 15 nötr lipit, % 5- 50 sterol ve % 0.5- 20 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda % 35- 65 formül I'in katyonik lipidini, % 3- 12 nötr lipit, % 15- 45 sterol ve % 0.5- 10 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda % 45- 65 formül I'in katyonik lipidini, % 5- 10 nötr lipit, % 25- 45 sterol ve % 0.5- 10 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 60 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 7.5 nötr lipit, yaklaşık % 31 sterol ve yaklaşık %

1.5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- DMG'dir (burada ayrıca PEG- C14 ya da C14- PEG olarak da ifade edilmektedir). Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit, 2,000 Da'lık bir ortalama molekül ağırlığına sahip olan bir PEG molekülü içerir. Diğer düzenlemelerde, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit 2,000'den daha az olan, örneğin 1,500 Da civarında, 1,000 Da civarında ya da 500 Da civarında olan bir ortalama molekül ağırlığına sahip bir PEG molekülü içerir. Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit, ortalama bir molekül ağırlığı 2,000 Da olan bir PEG molekülüne sahip olan aşağıdaki Formül VI'in bir bileşiğidir:



.

Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit PEG- distearoil gliseroldür (PEG- DSG, burada ayrıca PEG- C18 ya da C18- PEG olarak da ifade edilmektedir).

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 60 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 10 nötr lipit, yaklaşık % 38.5 sterol ve yaklaşık % 1.5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- DMG'dir (burada ayrıca PEG- C14 ya da C14- PEG olarak da ifade edilmektedir). Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit, PEG- distiril gliseroldür (PEG- DSG, burada ayrıca PEG- C18 ya da C18- PEG olarak da ifade edilmektedir). Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit, PEG- DPG'dir (PEG- dipalmitoilgliserol). Bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit ortalama bir molekül ağırlığı 2,000 Da olan bir PEG molekülü içerir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 50 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 10 nötr lipit, yaklaşık % 35 sterol, yaklaşık % 4.5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit ve yaklaşık % 0.5 hedefleme lipidi içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir,

sterol kolesteroldür, PEG lipit ise PEG- distearoil gliseroldür (PEG- DSG, burada ayrıca PEG- C18 ya da C18- PEG olarak da ifade edilmektedir) ve hedefleme lipidi Ga1NAc3- PEG- DSG'dir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 50 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 10 nötr lipit, yaklaşık % 35 sterol, yaklaşık % 4.5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit ve yaklaşık % 0.5 hedefleme lipidi içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür, PEG lipit PEG- DMG'dir (burada ayrıca PEG- C14 ya da C14- PEG olarak da ifade edilmektedir).

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 40 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 15 nötr lipit, yaklaşık % 40 sterol ve yaklaşık % 5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- DMG'dir (burada ayrıca PEG- C14 ya da C14- PEG olarak da ifade edilmektedir).

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 50 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 10 nötr lipit, yaklaşık % 35 sterol ve yaklaşık % 5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- DMG'dir (burada ayrıca PEG- C14 ya da C14- PEG olarak da ifade edilmektedir).

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 57.2 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 7.1 nötr lipit, yaklaşık % 34.3 sterol ve yaklaşık % 1.4 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DPPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- cDMA'dir (PEG- cDMA ayrıca Heyes ve arkadaşları tarafından ele alınmıştır (J. Controlled Release, 107, 276- 287 (2005)).

Ga1NAc3- PEG- DSG, bir düzenlemede, PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit, Formül VI'nin bir bileşiği ya da PEG- DSG'dir, burada PEG molekülleri 2000 Da'lık bir ortalama molekül ağırlığına sahiptir.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir molar bazda yaklaşık % 57.5 formül I'in katyonik lipidini, yaklaşık % 7.5 nötr lipit, yaklaşık % 31.5 sterol ve yaklaşık

% 3.5 PEG ya da PEG tarafından değiştirilmiş lipit içerir. Tercih edilen bir düzenlemede, katyonik lipit formül I'e ait bileşiktir, nötr lipit DSPC'dir, sterol kolesteroldür ve PEG lipit ise PEG- DMG'dir.

Bir düzenlemede, lipit : siRNA'nın oranı en azından yaklaşık 0.5 : 1, en azından yaklaşık 1 : 1, en azından yaklaşık 2 : 1, en azından yaklaşık 3 : 1, en azından yaklaşık 4 : 1, en azından yaklaşık 5 : 1, en azından yaklaşık 6 : 1, en azından yaklaşık 7 : 1, en azından yaklaşık 8 : 1, en azından yaklaşık 10 : 1, en azından yaklaşık 11 : 1, en azından yaklaşık 12 : 1, en azından yaklaşık 10 : 1'dir. Bir düzenlemede, lipit : siRNA'nın oranı, yaklaşık 1 : 1 ila yaklaşık 20 : 10, yaklaşık 3 : 1 ila yaklaşık 15 : 1, yaklaşık 4 : 1 ila yaklaşık 15 : 1, yaklaşık 5 : 1 ila yaklaşık 13 : 1 arasındadır. Bir düzenlemede, lipit : siRNA'nın oranı, yaklaşık 0.5: 1 ila yaklaşık 15: 1 arasındadır.

Bir yaklaşımda, gelişmiş lipit formülasyonu ayrıca bir hedefleme lipidi içerir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi bir Ga1NAc parçası (yani, bir N- galaktosamin parçası) içerir. Örneğin, bir Ga1NAc parçası içeren bir hedefleme lipidi 12.4.2008 tarihinde başvurulan USSN 12 / 328,669'da açıklananları içerebilir. Bir hedefleme lipidi ayrıca teknikte bilinen, örneğin, USSN 12 / 238,669 ya da Uluslararası Yayın No. WO 2008 / 042973'te açıklanan gibi herhangi bir başka lipidi ihtiva edebilir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi çok sayıda Ga1NAc parçası, örneğin iki ya da üç Ga1NAc parçası içerir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi çok sayıda, örneğin, iki ya da üç N- asetilgalaktosamin (Ga1NAc) parçası ihtiva eder. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidinde bulunan lipit, 1,2- Di- O- heksadesil- sn- gliserittir (yani, DSG'dir). Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi bir PEG parçası (örn., en az yaklaşık 500 Da, mesela yaklaşık 1000 Da, 1500 Da, 2000 Da ya da daha fazla olan bir molekül ağırlığına sahip bir PEG) içerir, örneğin, bu hedefleme parçası bir PEG parçası vasıtası ile lipide bağlıdır.

Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi, bir folat parçası içerir. Örneğin, bir folat parçası ihtiva eden bir hedefleme lipidi 12.4.2008 tarihinde başvurulan USSN 12 / 328,669'da açıklananları içerebilir. Bir başka düzenlemede, bir folat içeren bir hedefleme lipidi, Formül V'in bileşiğini içerebilir.

Örnek niteliğindeki hedefleme lipitleri aşağıdaki formül L ile temsil edilir:

$(\text{Hedefleme grubu})_n$- L- Lipit

formül L

burada

Hedefleme grubu, teknikte uzman biri tarafından bilinen ve / veya burada açıklanan herhangi bir hedefleme grubudur (örn., bir hücre yüzeyi reseptörü);

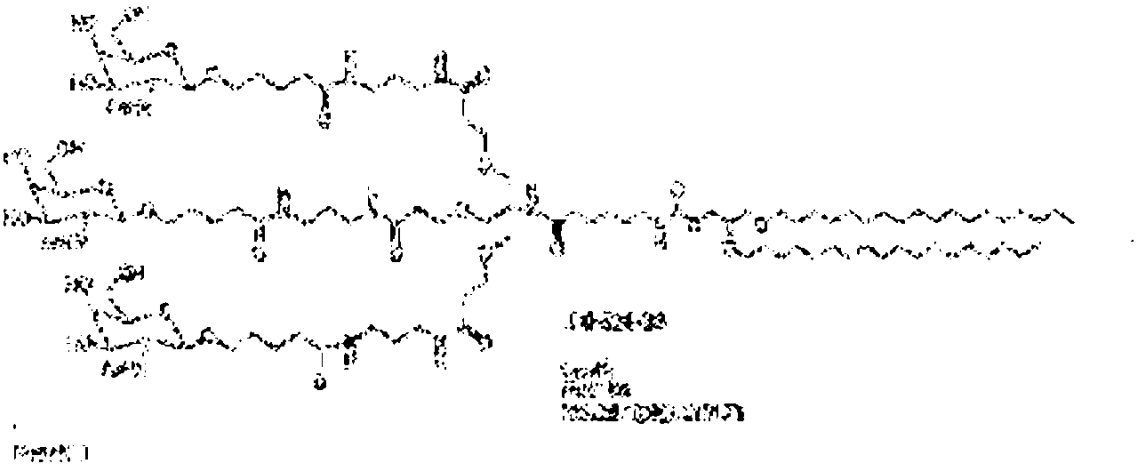
n, 1 ila 5 arasında (örn., 3) bir tamsayıdır,

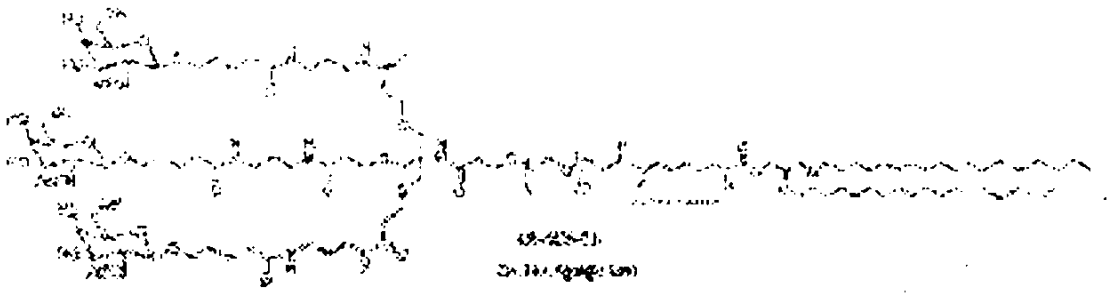
L, bir bağlantı grubudur ve

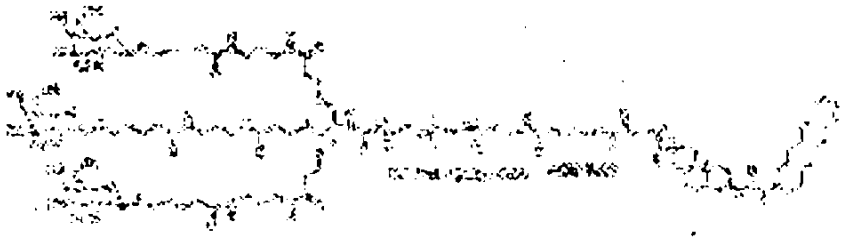
Lipit ise burada tarif edilen bir lipid gibi bir lipittir (örn., DSG gibi bir nötr lipit).

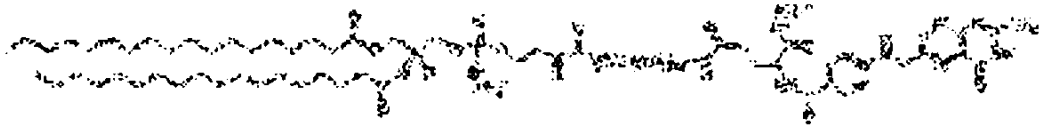
Bazı düzenlemelerde, bağlantı grubu bir PEG parçası içerir.

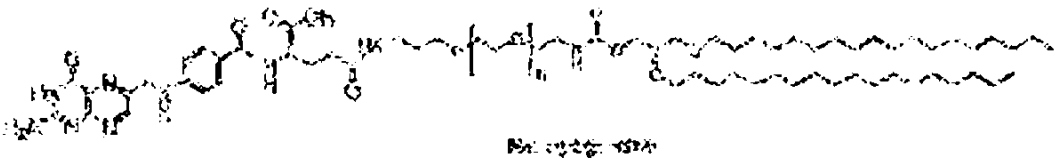
Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi, aşağıda sağlanan gibi bileşik II, III, IV ya da V'tir:

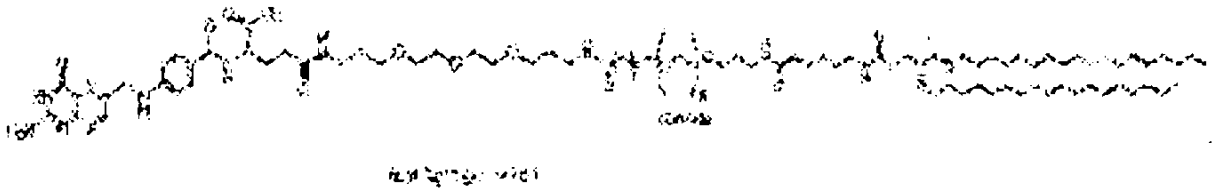












Bazı düzenlemelerde, formülasyon içinde hedefleme lipidi bir molar bazda, yaklaşık % 0.001 ila yaklaşık % 5 (örn., yaklaşık % 0.005, % 0.15, % 0.3, % 0.5, % 1.5, % 2, % 2.5, % 3, % 4 ya da % 5) arasındaki bir miktarda bulunur. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi yaklaşık % 0.005 ila yaklaşık % 1.5 arasındaki bir miktarda formülasyonda bulunur. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi burada tarif edilen bir formülasyonda ihtiva edilir.

Bazı düzenlemelerde, lipit formülasyonu ayrıca bir antioksidan (örn., bir radikal temizleyici) da içerir. Bu antidoksidan formülasyonda, örneğin, yaklaşık % 0.01 ila yaklaşık % 5 arasındaki bir miktarda bulunabilir. Antioksidan, hidrofobik ya da hidrofilik (örn., lipitlerde çözülebilen ya da suda çözülebilen) olabilir. Bazı düzenlemelerde, antioksidan, örneğin bütilhidroksitolüen, resveratrol, koenzim Q10 ya da diğer flavinoidler ya da bir vitamin, örneğin, E vitamini veya C vitamini gibi bir fenolik bileşik olabilir. Diğer örnek niteliğindeki antioksidanlar lipoik asit, ürik asit, beta- karoten ya da retinol (A vitamini) gibi bir karoten, glutation, melatonik, selenyum ve ubikinol.

Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidine (örn., lipit içeren bir Ga1NAc) yönelik reseptör, asyaloglikoprotein reseptörüdür (yani, ASGPR).

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir ekstrüzyon yöntemi ya da bir aynı eksende karıştırma yöntemi vasıtası ile üretilir.

Ekstrüzyon yöntemi (ayrıca, önceden şekillendirme yöntemi ya da kesikli işlem olarak da bilinmektedir), önce boş lipozomların (yani, nükleik asit bulunmaz) hazırlandığı, bunu boş lipozoma nükleik asit ilavesinin takip ettiği bir yöntemdir. Lipozom kompozisyonlarının küçük gözenekli bir polikarbonat membranı ya da asimetrik bir seramik membran vasıtası ile ekstrüzyonu, nispeten iyi tanımlanmış bir boyut dağılımı sağlar. Tipik olarak, süspansiyon istenilen lipozom kompleksi boyut dağılımına ulaşılana kadar bir ya da daha fazla defa membran üzerinden geçirilir. Bu lipozomlar,

lipozom boyutunda kademeli bir azalma elde edecek şekilde art arda daha küçük gözenekli membranlar üzerinden geçirilir. Bazı örneklerde, oluşturulan lipit- nükleik asit kompozisyonları herhangi bir boyutlama yapılmaksızın kullanılabilir. Bu yöntemler, US 5,008,050; US 4,927,637; US 4,737,323; Biochim Biophys Acta. 1979 Ekim 19; 557(l): 9- 23; Biochim Biophys Acta. 1980 Ekim 2; 601(3): 559- 7; Biochim Biophys Acta. 1986 Haziran 13; 858(1): 161- 8; ve Biochim. Biophys. Acta 1985 812, 55- 65'te açıklanmaktadır.

Aynı eksende karıştırma yöntemi ise hem lipitlerin hem de nükleik asidin paralel olarak bir karıştırma haznesine eklendiği bir yöntemdir. Karıştırma haznesi, basit bir T – bağlantısı ya da teknikte uzman biri tarafından bilinen herhangi bir karıştırma haznesi olabilir. Bu yöntemler, US patent numaraları 6,534,018 ve US6,855,277; US yayın numarası 2007 / 0042031 olan belgelerde ve Pharmaceuticals Research, Vol. 22, No. 3, Mar. 2005, sf. 362- 372'de açıklanmaktadır.

Ayrıca, burada açıklanan formülasyonların teknikte ortalama bir tecrübeye sahip kişi tarafından bilinen herhangi bir yöntemle de hazırlanabileceği anlaşılmaktadır.

Bir başka düzenlemede, formül I'in bileşiğini içeren temsili formülasyonlar Tablo 1'de betimlenmektedir.

Tablo 1

MC3	DSPC	Kolesterol	PEG
60	7.5	31	1.5
50	10	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
60	7.5	21	1.5

50	10	38.5	1.5
50	10	38.5	1.5
	20		
40	(DMPC)	38.5	1.5
30	30	38.5	1.5
	10		
50	(DMPC)	38.5	1.5
	30		
30	(DMPC)	38.5	1.5
	10		
51	(DLPC)	38.5	1.5
	20		
40	(DLPC)	38.5	1.5
40	20	38.5	1.5
40	10	40	10
60	10	20	10
40	20	37	3
60	10	27	3

Bir düzenlemede, formül I'in bileşimini içeren spesifik formülasyonlar aşağıdaki gibi açıklanmaktadır:

Lipitlerin Oranı (molar yüzde cinsinden)

Lipit : siRNA oranı

% 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol : PEG- DMG)

Lipit: siRNA ~ 11

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

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 35 / 4.5 / 0.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol: PEG- DSG (C18- PEG): Ga1NAc3- PEG- DSG)

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 30 / 9.5 / 0.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol: PEG- DSG: Ga1NAc3- PEG- DSG)

Lipit: siRNA oranı ~ 11

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

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (MC3 : DPPC : Kolesterol: PEG- DMG)

Lipit: siRNA oranı ~ 11

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

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 35 / 4.5 / 0.5 (MC3 : DPPC : Kolesterol: PEG- DSG: Ga1NAc3- PEG- DSG)

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 30 / 9.5 / 0.5 (MC3 : DPPC : Kolesterol: PEG- DSG: Ga1NAc3- PEG- DSG)

Lipit: siRNA oranı ~ 11

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

Lipit: siRNA oranı ~ 11

% 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol: PEG- DMG)

Lipit: siRNA oranı ~ 7

% 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol: PEG- DSG)

Lipit: siRNA oranı ~ 10

% 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (MC3 : DSPC : Kolesterol: PEG- DMG)

Lipit: siRNA oranı ~ 12

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

Lipit: siRNA oranı ~ 8

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

Lipit: siRNA oranı ~ 10

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar en az % 75, en az % 80 ya da en az % 90 tarafından tutulur.

Bir düzenlemede, burada tarif edilen formülasyonlar, bir apolipoprotein içerir. Burada kullanıldığı haliyle "apolipoprotein" ya da "lipoprotein" teknikte uzman kişilerce bilinen apolipoproteinleri ve bunun varyantlarını fragmanlarını ve bunun aşağıda açıklanan apolipoprotein agonistlerini, analoglarını ya da fragmanlarını ifade eder.

Uygun apolipoproteinler, ApoA- I, ApoA- II, ApoA- IV, ApoA- V ve ApoE ve bunların aktif polimorfik formlarını, izoformlarını, varyantlarını ve mutantlarının yanı sıra bunların fragmanlarını ya da kesilmiş formlarını içermekte, ancak bunlarla sınırlandırılmamaktadır. Bazı belirli düzenlemelerde, apolipoprotein, tiol içerikli bir apolipoproteindir. "Tiol içerikli apolipoprotein" terimi, en az bir sistein kalıntısını içeren bir apolipoprotein, varyant, fragment ya da izoformu anlamına gelir. Apolipoproteinleri içeren en yaygın tiol, bir sistein kalıntısını içeren ApoA- I Milano (ApoA- I_M) ve ApoA- I Paris'tir (ApoA- I_P) (Jia ve diğ., 2002, Biochem. Biophys. Res. Comm. 297: 206- 13; Bielicki ve Oda, 2002, Biochemistry 41: 2089- 96 sayılı belge). ApoA- II, ApoE2 ve ApoE3 de aynı zamanda tiol içerikli apolipoproteinlerdir. İzole edilmiş ApoE ve / veya bunların aktif fragmanları ve polipeptid analogları, bunların rekombinant olarak üretilen formları da dahil olmak üzere, U.S. Pat. No- lar. 5,672,685; 5,525,472; 5,473,039; 5,182,364; 5,177,189; 5,168,045; 5,116,739 sayılı belgelerde tarif edilmektedir. ApoE3, Weisgraber, ve diğ., "Human E apoprotein heterogenity: cysteine- arginine interchanges in the amino asit sequence of the apo- E isoforms," J. Biol. Chem. (1981) 256: 9077- 9083; ve Rail, ve diğ., "Structural basis for receptor binding heterogenity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects," Proc. Nat. Acad. Sci.

(1982) 79: 4696- 4700 sayılı belgelerde açıklanmıştır. Aynı zamanda, bakınız Gen Bankası Erişim numarası K00396.

Belirli düzenlemelerde, apolipoprotein, apolipoproteinin bir fragmanı, varyantı ya da izoformu olabilir. "Fragman" terimi, bir doğal apolipoproteininkinden daha kısa bir amino asit sekansına sahip olan ve fragmanın, lipit bağlama özellikleri de dahil olmak üzere, doğal apolipoproteinin aktivitesini muhafaza ettiği herhangi apolipoprotein anlamına gelir. "Varyant" terimi ile, apolipoproteinin amino asit sekanslarındaki ikameler ya da değişiklikler kast edilmekte olup, amino asit kalıntılarının ikameleri ya da değişikleri, örneğin, ilaveler ve silmeler, lipit bağlanma özellikleri de dahil olmak üzere, doğal apolipoproteinin aktivitesini ortadan kaldırmaz. Dolayısıyla, bir varyant, burada bir ya da daha fazla amino asit kalıntısının, kimyasal olarak benzer amino asitler ile konservatif olarak ikame edilmiş olduğu, bunun içinde temin edilen bir doğal apolipoproteine büyük ölçüde özdeş bir amino asit sekansına sahip olan bir protein ya da peptidi içerebilir. Konservatif ikamelere ait örnekler, örneğin izolösin, valin, lösin ya da metionin gibi bir diğeri için en az bir hidrofobik kalıntının ikamesini içerir. Benzer bir şekilde, örneğin arjinin ve lisin arasındaki, glutamin ve asparajin arasındaki ve glisin ve serin arasındaki gibi örneğin en az bir hidrofilik kalıntının ikamesi üzerine durmaktadır (bakınız U.S. Pat. No'lar. 6,004,925, 6,037,323 ve 6,046,166 sayılı belgeler). "İzoform" terimi, aynı, daha büyük ya da kısmi fonksiyona ve benzer, özdeş ya da kısmi sekansa sahip olan bir protein anlamına gelir ve aynı gen ve genellikle dokuya özgü bir ürün olabilir ya da olmayabilir (bakınız Weisgraber 1990, J. Lipid Res. 31(8): 1503- 11; Hixson ve Powers 1991, J. Lipid Res. 32(9): 1529- 35; Lackner ve diğ., 1985, J. Biol. Chem. 260(2): 703- 6; Hoeg ve diğ., 1986, J. Biol. Chem. 261(9): 3911- 4; Gordon ve diğ., 1984, J. Biol. Chem. 259(1): 468- 74; Powell ve diğ., 1987, Cell 50(6): 831- 40; Aviram ve diğ., 1998, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 18(10): 1617- 24; Aviram ve diğ., 1998, J. Clin. Invest. 101(8): 1581- 90; Billecke ve diğ., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11): 1335- 42; Draganov ve diğ., 2000, J. Biol. Chem. 275(43): 33435- 42; Steinmetz ve Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4): 2258- 64; Widler ve diğ., 1980, J. Biol. Chem. 255(21): 10464- 71; Dyer ve diğ., 1995, J. Lipid Res. 36(1): 80- 8; Sacre ve diğ., 2003, FEBS Lett. 540(1- 3): 181- 7; Weers, ve diğ., 2003, Biophys. Chem. 100(1- 3): 481- 92; Gong ve diğ., 2002, J. Biol. Chem. 277(33): 29919- 26; Ohta ve diğ., 1984, J. Biol. Chem. 259(23): 14888- 93 ve U.S. Pat. No. 6,372,886 sayılı belgeler).

Bazı düzenlemelerde, bunun tarif edilen yöntemler ve kompozisyonlar, bir apolipoproteinin bir kimerik yapısının kullanımını içerir. Örneğin, bir apolipoproteinin bir kimerik yapısı, iskemi reperfüzyon koruyucu özellikleri içeren bir apolipoprotein etki alanı ile ilişkili yüksek lipit bağlama kapasitesine sahip bir apolipoprotein etki alanından oluşabilir. Bir apolipoproteinin kimerik bir yapısı, bir apolipoprotein (yani, homolog yapı) içerisindeki ayrı bölgeleri içeren bir yapı olabilir ya da bir kimerik yapı, farklı apolipoproteinler (yani, heterolog yapılar) arasındaki ayrı bölgeleri içeren bir yapılanma olabilir. Bir kimerik yapılanmayı içeren kompozisyonlar da aynı zamanda belirli bir karaktere (örneğin, lipid bağlanması, reseptör bağlanması, enzimatik, enzim aktive etme, antioksidan ya da indirgenme- yükseltgenme özelliği) sahip olacak şekilde tasarlanmış apolipoprotein varyantları ya da segmentleri olan segmentleri içerebilir (bakınız Weisgraber 1990, J. Lipid Res. 31(8): 1503- 11; Hixson ve Powers 1991, J. Lipid Res. 32(9): 1529- 35; Lackner ve diğ., 1985, J. Biol. Chem. 260(2): 703- 6; Hoeg et al, 1986, J. Biol. Chem. 261(9): 3911- 4; Gordon ve diğ., 1984, J. Biol. Chem. 259(1): 468- 74; Powell ve diğ., 1987, Cell 50(6): 831- 40; Aviram ve diğ., 1998, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18(10): 1617- 24; Aviram ve diğ., 1998, J. Clin. Invest. 101(8): 1581- 90; Billecke ve diğ., 2000, Drug Metab. Dispos. 28(11): 1335- 42; Draganov ve diğ., 2000, J. Biol. Chem. 275(43): 33435- 42; Steinmetz ve Utermann 1985, J. Biol. Chem. 260(4): 2258- 64; Widler ve diğ., 1980, J. Biol. Chem. 255(21): 10464- 71; Dyer ve diğ., 1995, J. Lipid Res. 36(1): 80- 8; Sorenson ve diğ., 1999, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19(9): 2214- 25; Palgunachari 1996, Arterioscler. Throb. Vasc. Biol. 16(2): 328- 38: Thurberg ve diğ., J. Biol. Chem. 271(11): 6062- 70; Dyer 1991, J. Biol. Chem. 266(23): 150009- 15; Hill 1998, J. Biol. Chem. 273(47): 30979- 84 sayılı belgeler).

Burada kullanılan apolipoproteinler de aynı zamanda, rekombinant, sentetik, yarı-sentetik ya da saflaştırılmış apolipoproteinleri içerir. Burada kullanılan bunların apolipoproteinlerini ya da eşdeğerlerini elde edilmesi için yöntemler, teknikte iyi bilinmektedir. Örneğin, apolipoproteinler, örneğin yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ya da immünoafinite kromatografisi ile plazma ya da doğal ürünlerden ayrılabilir ya da sentetik bir şekilde veya yarı sentetik bir şekilde ya da teknikte bilgili kişilerce bilinen rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretilebilir (bakınız, örneğin, Mulugeta ve diğ., 1998, J. Chromatogr. 798(1- 2): 83- 90; Chung ve diğ., 1980, J. Lipid Res. 21 (3): 284-91; Cheung ve diğ., 1987, J. Lipid Res. 28(8): 913- 29; Persson, ve diğ., 1998, J.

Chromatogr. 711: 97- 109; U.S. Pat. No'lar. 5,059,528, 5,834,596, 5,876,968 ve 5,721,114; ve PCT Yayınları WO 86 / 04920 ve WO 87 / 02062 sayılı belgeler).

Burada kullanılan apolipoproteinler ayrıca, ApoA- I, ApoA- I Milano (ApoA- I_M), ApoA- I Paris (ApoA- I_P), ApoA- II, ApoA- IV, ve ApoE etkisini taklit eden peptidler ve peptid analogları gibi apolipoprotein agonistlerini içerir. Örneğin, apolipoprotein, U.S. Pat. No'lar. 6,004,925, 6,037,323, 6,046,166, ve 5,840,688 sayılı belgelerde tarif edilmiş olanların herhangi birisi olabilir.

Apolipoprotein agonist peptidleri ya da peptid analogları, örneğin, U.S. Pat. No'lar. 6,004,925, 6,037,323 ve 6,046,166 sayılı belgelerde tarif edilen teknikler de dahil olmak üzere peptid sentezi için teknikte bilinen herhangi teknik kullanılarak sentezlenebilir ya da üretilebilir. Örneğin, peptidler, başlangıçta Merrifield (1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149- 2154 sayılı belge) tarafından tarif edilen katı- fazlı sentetik teknik kullanılarak hazırlanabilir. Diğer peptid sentezi teknikleri, Bodanszky ve diğ., Peptid Synthesis, John Wiley & Sons, 2. Baskı, (1976) sayılı belgede ve teknikte tecrübeli kişilerce kolaylıkla temin edilebilen diğer referanslarda bulunabilir. Polipeptid sentezi tekniklerinin bir özeti, Stuart ve Young, Solid Phase Peptid. Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, 111., (1984) sayılı belgede bulunabilir. Peptidler de aynı zamanda The Proteins, Cilt. II, 3. Baskı., Neurath ve diğ., Eds., syf. 105- 237, Academic Press, New York, N.Y. (1976) sayılı belgede tarif edildiği üzere çözelti yöntemleri tarafından sentezlenebilir. Farklı peptid sentezlerinde kullanıma yönelik uygun koruyucu grupları, yukarıda bahsi geçen metinlerde yanı sıra McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, N.Y. (1973) sayılı belgede tarif edilmiştir. Burada tarif edilen peptidler de aynı zamanda, örneğin apolipoprotein A- I'in büyük parçalarından kimyasal ya da enzimatik parçalanma ile hazırlanabilir.

Bazı düzenlemelerde, apolipoprotein, apolipoproteinlerin bir karışımı olabilir. Bir düzenlemede, apolipoprotein bir homojen karışım olabilir, yani, apolipoproteinin tekli bir türüdür. Başka bir düzenlemede, apolipoprotein, apolipoproteinlerin bir heterojen karışımı olabilir, yani, iki ya da daha farklı apolipoproteinlerin bir karışımıdır. Apolipoproteinlerin heterojen karışım uygulamaları, örneğin, bir hayvan kaynağından bir apolipoproteinin ve bir yarı sentetik kaynaktan bir apolipoproteinin bir karışımını içerir. Bazı düzenlemelerde, bir heterojen karışım, örneğin, ApoA- I ve ApoA- I Milano'nın bir karışımını içerebilir. Bazı düzenlemelerde, bir heterojen karışım, örneğin,

ApoA- I Milano ve ApoA- I Paris'in bir karışımını içerebilir. Burada tarif edilen yöntemler ve kompozisyonlarda kullanıma yönelik uygun karışımlar teknikte tecrübeli kişiler için aşikar olacaktır.

Apolipoprotein doğal kaynaklardan elde edilirse, bir bitki ya da hayvan kaynağından elde edilebilir. Apolipoprotein bir hayvan kaynağından elde edilirse, apolipoprotein herhangi bir türden olabilir. Bazı düzenlemelerde, apolipoprotein bir hayvan kaynağından elde edilebilir. Bazı düzenlemelerde, apolipoprotein bir insan kaynağından elde edilebilir. Tercih edilen düzenlemelerde, apolipoprotein, apolipoproteinin uygulandığı birey ile aynı türden elde edilir.

Bir düzenlemede, hedef gen Faktör VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF beta geni, Erb- B geni, Src geni, CRK geni, GRB2 geni, RAS geni, MEKK geni, JNK geni, RAF geni, Erk1 / 2 geni, PCNA(p21)geni, MYB geni, JUN geni, FOS geni, BCL- 2 geni, Siklin D geni, VEGF geni, EGFR geni, Siklin A geni, Siklin E geni, WNT-1 geni, beta- katenin geni, c- MET geni, PKC geni, NFKB geni, STAT3 geni, survivin geni, Her2 / Neu geni, topoizomeraz I geni, topoizomeraz II alfa geni, p73 geni, p21(WAFI / C1P1) geni, p27(KIP1) geni, PPM1D geni, RAS geni, kaveolin I geni, MIB I geni, MTAI geni, M68 geni, tümör baskılayıcı genler ve p53 tümör baskılayıcı geni ve bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilir. Bir düzenlemede, hedef gen, karaciğerde eksprese edilen bir gendir, örneğin, Faktör VII (FVII) geni gibi. Hedef genin, örn., FVII'nin ekspresyonunun etkisi bir serum ya da doku numunesi gibi biyolojik bir numunedeki FVII seviyelerinin ölçülmesi ile değerlendirildi. Örneğin, kandaki FVII'nin seviyesi örn., FVII aktivitesinin analiz edilmesi ile ölçüldüğü gibi belirlenebilir. Bir düzenlemede, karaciğerdeki mRNA seviyesi değerlendirilebilir. Bir başka tercih edilen düzenlemede, en az iki tip değerlendirme yapılır, örneğin, (örn., kandaki) protein seviyesine dair bir değerlendirme ve (örn., karaciğerdeki) mRNA seviyesine dair bir ölçümün ikisi de yapılır.

Bir düzenlemede, ajan, bir çift sarmallı RNA (dsRNA) gibi bir nükleik asittir.

Bir başka düzenlemede, nükleik asit ajanı, bir tek sarmallı DNA ya da RNA veya çift sarmallı DNA ya da RNA veya DNA- RNA hibritidir. Örneğin, bir çift sarmallı DNA, bir yapısal gen, kontrol ve sonlanma bölgeleri içeren bir gen ya da bir viral ya da plazmit DNA gibi kendi kendini yenileyen bir sistem olabilir. Çift sarmallı bir RNA örn., bir dsRNA ya da başka bir RNA interferans reaktifi olabilir. Bir tek sarmallı nükleik asit,

örn., bir antisens oligonükleotit, ribozim, mikroRNA ya da üçlü sarmal oluşturan oligonükleotit olabilir.

Yine bir başka düzenlemede, aday bir ajanın uygulanmasından sonra çeşitli zaman noktalarında, örneğin, kan, plazma ya da serum benzeri bir sıvı numune ya da bir karaciğer numunesi benzeri bir doku numunesi gibi bir biyolojik numune denekten alınır ve ajanın hedef protein ya da mRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki bir etkisi için test edilir. Özellikle tercih edilen bir düzenlemede, aday ajan, FVII'yi hedefleyen bir dsRNA'dır ve biyolojik numune Faktör VII proteini ya da mRNA seviyeleri üzerinde bir etki açısından test edilir. Bir düzenlemede, FVII proteininin plazma seviyeleri örneğin, bir immünohistokimya analizi ya da bir kromojenik analiz kullanılarak analiz edilir. Bir başka düzenlemede, karaciğerdeki FVII mRNA seviyeleri, bir dallanmış DNA analizi ya da bir Northern blot ya da RT- PCR analizi gibi bir analiz ile test edilir.

Bir düzenlemede, ajan, örneğin, gelişmiş lipit formülasyonunu içeren bir kompozisyon toksisite bakımından değerlendirilir. Yine bir başka düzenlemede, model denek, ağırlıktaki ya da kafes yanı davranışındaki bir değişiklik ile fiziksel etkiler bakımından izlenebilir.

Bir düzenlemede, yöntem ayrıca, örneğin gelişmiş lipit formülasyonunu içeren ajanın başka bir değerlendirmeye daha konu edilmesini içerir. Bu diğer değerlendirme, örneğin (i) yukarıda tarif edilen değerlendirmenin bir tekrarını, (ii) yukarıda tarif edilen değerlendirmenin farklı sayıda hayvanlar ya da farklı dozlar ile bir tekrarını ya da (iii) örneğin, insan dışı bir primat gibi bir başka hayvan modelinde değerlendirilmesi gibi farklı bir yöntem ile değerlendirilmesini içerebilir.

Bir başka düzenlemede, ajanın ve gelişmiş lipit formülasyonu içerip içermediğine göre bir klinik deney gibi diğer çalışmalarda aday ajanın karaciğer proteini ya da mRNA seviyelerinin gözlenen etkisine bağlı olarak bir karar verilir. Örneğin, eğer bir aday dsRNA'nın, en az % 20, % 30, % 40, % 50 ya da daha fazla oranda protein ya da mRNA seviyelerini azalttığı gözlemlenirse, bu durumda ajan klinik bir deney için dikkate alınabilir.

Yine bir başka düzenlemede, aday ajanın ve amino lipidin karaciğer proteini ya da mRNA seviyeleri üzerindeki etkisine bağlı olarak farmasötik bir kompozisyonda ajanın ya da gelişmiş lipit formülasyonun içerilip içerilmediğine göre bir karar verilir. Örneğin, eğer bir aday dsRNA'nın, en az % 20, % 30, % 40, % 50 ya da daha fazla oranda

protein ya da mRNA seviyelerini azalttığı gözlemlenirse, bu durumda ajan klinik bir deney için dikkate alınabilir.

Bir diğer yaklaşımda, burada tarif edilen, gelişmiş lipit formülasyonunun bir terapötik ajanın bir hücreye verilmesi için uygunluğu açısından değerlendirilmesine dair bir yöntemdir. Bazı düzenlemelerde, burada tarif edilen, örneğin, FVII'yi hedefleyen bir dsRNA gibi bir RNA tabanlı yapının verilmesi için gelişmiş lipit formülasyonunun uygunluğunun değerlendirilmesine dair bir yöntemdir. Bu yöntem, FVII'yi hedefleyen bir dsRNA ve bir aday amino lipit içeren bir kompozisyonun sağlanmasını, kompozisyonun örn., bir fare gibi bir kemirgene uygulanmasını, kandaki FVII seviyesi ya da karaciğerdeki FVII mRNA seviyesinden en az birinin fonksiyonu olarak FVII ekspresyonunun değerlendirilmesini, böylece de aday amino lipidin değerlendirilmesini içerir. Bazı düzenlemelerde, yöntem ayrıca hedef genin önceden seçilmiş bir referans değer ile karşılaştırılmasını içerir.

Lipit içeren bileşenler ihtiva eden bir lipozom gibi kompozisyonlar ve bunlar aşağıda daha detaylı açıklanmaktadır. Örnek niteliğindeki nükleik asit tabanlı ajanlar dsRNA'lar, antisens oligonükleotitler, ribozimler, mikroRNA'lar, bağışıklığı baskılayıcı oligonükleotitler ya da üç sarmal oluşturan oligonükleotitler. Bu ajanlar da aşağıda ayrıca daha detaylı açıklanmaktadır.

"Alkil", bir düz zincirli ya da dallanmış, siklik olmayan ya da siklik, 1 ila 24 arasında karbon atomu içeren doymuş alifatik hidrokarbon anlamına gelir. Temsilci doymuş düz zincirli alkiller, metil, etil, n- propil, n- bütil, n- pentil, n- hekzil, ve benzerlerini içerirken; doymuş dallı alkiller izopropil, sec- bütil, izobütil, tert- bütil, izopentil, ve benzerlerini içerir. Temsilci doymuş siklik alkiller, siklopropil, siklobütil, siklopentil, siklohekzil, ve benzerlerini içerirken; doymamış siklik alkiller, siklopentenil ve siklohekzenil, ve benzerlerini içerir.

"Alkenil", yukarıda tarif edilen gibi, bitişik karbon atımları arasında en az bir çift bağ içeren bir alkil anlamına gelir. Alkeniller hem cis hem de trans izomerler içerir. Temsilci düz zincirli ve dallı alkeniller, etilenil, propileni, 1- bütenil, 2- bütenil, isobütilenil, 1- pentenil, 2- pentenil, 3- metil- 1- bütenil, 2- metil- 2- bütenil, 2,3- dimetil- 2- bütenil, ve benzerlerini içerir.

"Alkinil", yukarıda tarif edilen gibi, bitişik karbon atomları arasında ek olarak en az bir üçlü bağ içeren herhangi bir alkili ya da alkenili ifade eder. Temsilci düz zincirli ve dallı

alkiniller, asetilenil, propinil, 1- bütinil, 2- bütinil, 1- pentinil, 2- pentinil, 3- metil- 1 bütinil, ve benzerlerini içerir.

"Asil", ek yerindeki karbonun aşağıda tanımlanan gibi bir okso grubu ile ikame edildiği herhangi bir alkil, alkenil ya da alkinil anlamına gelir. Örneğin,- C(= O) alkil,- C(= O) alkenil ve –C(= O) alkinil'ler asil gruplarıdır.

"Aril" terimi, içerisinde herhangi bir halka atomumun ikame edilebildiği bir aromatik monosiklik, bisiklik, ya da trisiklik hidrokarbon halka sistemini ifade eder. Aril parçalarının örnekleri, fenil, naftil, antrasenil ve pirenili içermekte ancak bunlarla sınırlandırılmamaktadır.

"Heterosikl", bir 5- ila 7- elemanlı monosiklik ya da 7- ila 10- elemanlı bisiklik heterosiklik halkayı ifade eder, bu doymuş, doymamış ya da aromatiktir ve bağımsız olarak azot, oksijen ve sülfürden seçilen 1 ila 2 heteroatom ihtiva eder ve azot ve sülfür heteroatomları isteğe bağlı olarak oksitlenebilir ve azot heteroatomu isteğe bağlı olarak, yukarıdaki heterosikllerin herhangi birinin bir benzen halkasına kaynaştırıldığı bisiklik halkaları dahil olmak üzere kuaternize edilebilir. Heterosikl herhangi bir heteroatom ya da karbon atomu vasıtası ile eklenebilir. Heterosikller aşağıda tanımlanan gibi heteroariller içerirler. Heterosikller, morfolinil, pirolidinonil, pirolidinil, piperidinil, piperizinil, hidantoinil, valerolaktamil, oksiranil, oksetanil, tetrahidrofuranil, tetrahidropiranil, tetrahidropiridinil, tetrahidroprimidinil, tetrahidrotiofenil, tetrahidrotiropiril, tetrahidropirimidinil, tetrahidrotiofenil, tetrahidrotiropiril, ve benzerlerini içerir.

"İsteğe bağlı olarak ikame edilmiş alkil", "isteğe bağlı olarak ikame edilmiş alkenil", "isteğe bağlı olarak ikame edilmiş alkinil", "isteğe bağlı olarak ikame edilmiş asil" ve "isteğe bağlı olarak ikame edilmiş heterosikl" terimleri, ikame edildiğinde, en az bir hidrojen atomunun bir ikame edici ile değiştirildiği anlamına gelir. Bir okso ikame edici (= O) durumunda, iki hidrojen atomu değiştirilir. Bu bakımdan, ikame ediciler, okso, holojen, heterosikl, CN,- OR^X,- NR^XR^Y,- $NR^XC(= O)R^Y$,- $NR^XSO_2R^Y$,- $C(= O)R^X$,- $C(= O)OR^X$,- $C(= O)NR^XR^Y$,- SO_nR^X ve- $SO^nNR^xR^y$'yi içerir, burada n, 0, 1 ya da 2'dir, Rx ve Ry aynı ya da farklı ve bağımsız olarak hidrojen, alkil ya da heterosikldir ve bahsedilen alkil ve heterosikl ikame edicilerinin her biri okso, halojen,- OH,- CN, alkil,- ORx, heterosikl,- NR^XR^Y,- $NR^XC(= O)R^Y$,- $NR^XSO_2R^Y$,- $C(= O)R^X$,- $C(= O)OR^X$,- $C(= O)NR^XR^Y$, SO_nR^X ve- $SO^nNR^xR^y$'den biri ya da daha fazlası ile ayrıca ikame edilebilir.

“Heteroaril” terimi, monosiklik ise 1- 3 heteroatoma, bisiklik ise 1- 6 heteroatoma ya da trisiklik ise 1- 9 heteroatoma sahip olan bir aromatik 5- 8 elemanlı monosiklik, 8- 12 elemanlı bisiklik ya da 11- 14 elemanlı trisiklik halka sistemini ifade eder, burada bahsi geçen heteroatomlar, O, N, ya da S arasından seçilir (örneğin, sırasıyla monosiklik, bisiklik, ya da trisiklik olduğunda N, O, ya da S'e ait karbon atomları ve 1- 3, 1- 6, ya da 1- 9 heteroatomlar), içerisinde herhangi halka atomu ikame edilmiş olabilir. Burada tarif edilen heteroaril gruplar, ayrıca bir ortak karbon- karbon bağını paylaşan kaynaşık halkaları içerebilir. "Alkilheterosikl" terimi, halka atomlarının en az birinin, alkil, alkenil ya da alkinil ile ikame edildiği bir heteroaril anlamına gelir.

“İkame edilmiş” terimi, belirli bir yapı içindeki bir ya da daha fazla hidrojen radikalinin halo, alkil, alkenil, alkinil, aril, heterosiklil, tiol, alkiltio, okzo, tioksi, ariltio, alkiltio alkil, ariltio alkil, alkilsülfonil, alkilsülfonil alkil, arilsülfonil alkil, alkoksi, ariloksi, aralkoksi, aminokarbonil, alkilaminokarbonil, arilaminokarbonil, alkoksikarbonil, ariloksikarbonil, halo alkil, amino, trifloromethil, siyano, nitro, alkilamino, arilamino, alkilamino alkil, arilamino alkil, amino alkilamino, hidroksi, alkoksi alkil, karboksi alkil, alkoksikarbonil alkil, aminokarbonil alkil, asil, aralkoksikarbonil, karboksilik asit, sülfonik asit, sülfonil, fosfonik asit, aril, heteroaril, heterosiklik, ve alifatik içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan belirlenmiş bir ikame edici radikal ile değiştirilmesini ifade eder. İkame edicinin ayrıca ikame edilebileceği anlaşılmalıdır. “Halojen”, floro, kloro, bromo ve iyodo anlamına gelir.

"Alkilamin" ve "dialkilamin" terimleri, sırasıyla- NH(alkil) ve- N(alkil)$_2$ radikallerini ifade eder.

“Alkilfosfat” terimi,- O- P(Q')(Q")- O- R'yi ifade etmekte olup, burada Q' ve Q" her biri bağımsız olarak O, S, N(R)$_2$'dir, isteğe bağlı olarak alkil ya da alkoksi ile ikame edilir; ve R, isteğe bağlı olarak ikame edilmiş alkildir, ω- aminoalkil ya da ω- (ikame edilmiş) aminoalkildir.

“Alkilfosforotionat” terimi, Q' ya da (Q")'den en az birinin S olduğu bir alkilfosfatı ifade eder.

“Alkilfosfonat” terimi, Q' ya da (Q")'den en az birinin alkil olduğu bir alkilfosfatı ifade eder.

“Hidroksialkil” terimi,- O- alkil radikali anlamına gelir.

"Alkilheterosikl" terimi, en az bir metilenin bir heterosikl ile değiştirildiği bir alkili ifade eder.

"ω- aminoalkil" terimi,- alkil- NH2 radikalini ifade eder. Ve "ω- (ikame edilmiş) aminoalkil" terimi, H ya da N'den en az birinin alkil ile değiştirildiği bir ω- aminoalkili ifade eder.

"ω- fosfooalkil" terimi, Q' ya da (Q")'den her birinin bağımsız olarak O ya da S olduğu ve R'nin isteğe bağlı olarak ikame edilmiş alkil olduğu- alkil- O- P(Q')(Q")- O- R'yi ifade eder.

"ω- tiofosfooalkil" terimi, Q' ya da (Q")'den en az birinin S olduğu ω- fosfooalkili ifade eder.

Bazı düzenlemelerde, burada tarif edilen yöntemler koruyucu grupların kullanımını gerektirebilir. koruyucu grup metodolojisi, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir (bakınız, örneğin, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. ve diğ., Wiley- Interscience, New York City, 1999).). Kısaca, bu açıklama bağlamında koruyucu gruplar, bir fonksiyonel grubun istenmeyen reaktivitesini azaltan ya da ortadan kaldıran herhangi bir gruptur. Bir fonksiyonel grup, belirli bir reaksiyon sırasında reaktivitesini maskelemek için fonksiyonel bir gruba eklenebilir ve daha sonra orijinal fonksiyonel grubu ortaya çıkarmak için çıkarılabilir. Bazı uygulamalarda "alkol koruyucu grup" kullanılır. Bir "alkol koruyucu grup", ya da bir alkol fonksiyonel grubunun istenmeyen reaktivitesini ortadan kaldıran herhangi bir gruptur. Koruyucu gruplar, teknikte iyi bilinen teknikler kullanılarak eklenebilir ve çıkarılabilir.

Lipit Partikülleri

Burada öne çıkan karaciğer izleme modelinde test etmeye yönelik ajanlar ve / veya amino lipitler, lipit partikülleri içinde formüle edilebilir. Lipit partikülleri, lipozomları içerir, ancak bunlarla sınırlı tutulamaz. Burada kullanıldığı haliyle, bir lipozom sulu bir iç kısmı içine alan lipit ihtiva eden membranlara sahip bir yapıdır. Lipozomlar, bir ya da daha fazla lipit membrana sahip olabilir. Tekli lamellar olarak da ifade edilen tek katmanlı lipozomları ve çoklu lamellar olarak da ifade edilen çok katmanlı lipozomların her ikisi de tasarlanmaktadır. Nükleik asitler ile kompleks haline geldiğinde, lipit partikülleri de aynı zamanda, örneğin Feigner, Scientific American belgesinde tarif edildiği gibi, DNA katmanları arasına sandviç haline getirilmiş katyonik lipit çift katmanlarından oluşan lipopleksler olabilir.

Lipit partikülleri ayrıca bir ya da daha fazla ilave lipitleri ve / veya kolesterol gibi başka bileşenleri içerebilir. Diğer lipitler, lipozom kompozisyonları içine, lipozom yüzeyi üzerine ligandları bağlamak için ya da lipit oksidasyonunu önlemek için gibi çeşitli amaçlar için dahil edilebilir. Amfipatik, nötr, katyonik ve anyonik lipitler de dahil olmak üzere bunun içinde tarif edilen lipozomlarda çok sayıdaki lipitlerden herhangi birisi mevcut bulunabilir. Bu tür lipitler, tek başına ya da kombinasyon halinde kullanılabilir. Mevcut olabilecek ilave lipit bileşenlerinin spesifik örnekleri aşağıda açıklanmaktadır.

Bir lipit partikülünde mevcut olabilen ilave bileşenler, örneğin poliamid oligomerleri (bakınız, örneğin, U.S. Patent No. 6,320,017 sayılı belge), peptitler, proteinler, deterjanlar, örneğin, seramidlere konjuge edilmiş PEG ve fosfatidiletanolamin'e bağlanmış PEG gibi lipit türevleri (bakınız, U.S. Patent No. 5,885,613) gibi çift katmanlı stabilize edici bileşenleri içerir. Bazı düzenlemelerde, lipit partikülü bir hedefleme ajanı, örneğin burada tarif edilen bir hedefleme lipidi içerir.

Bir lipit partikülü, bir ikinci amino lipit ya da katyonik lipit, bir nötr lipit, bir sterol ve oluşum sırasında yüke bağlı agregasyonunu önleyen partiküllerin sterik stabilizasyonundan kaynaklanabilir olan, oluşum sırasında lipit partiküllerinin toplanmasını azaltmak için seçilen bir lipit içerebilir.

Burada kullanıldığı haliyle, "katyonik lipit" terimi, fizyolojik pH'ta katyonik bir lipiti oluşturmak üzere protonlanabilir olan bir amino baş grubunu (bir alkilamino ya da dialkilamino grubu da dahil olmak üzere) ve bir ya da iki yağlı asit ya da yağlı alkil zincirlerinesahip olan lipitleri içermek kast edilir. Bazı düzenlemelerde, bir katyonik lipit bir "amino lipit" olarak ifade edilir.

Diğer katyonik lipitler, burada alkil ikame edicilerin farklı olduğu (örn. N- etil- N-metilamino- , N- propil- N- etilamino- ve benzeri) olanlar dahil olmak üzere, alternatif yağlı asit grupları ve diğer dialkilamino gruplarına sahip olanları içerir. Genelde, daha az doymuş asil zincirlerine sahip olan lipitler (örneğin, bir katyonik lipit), özellikle kompleksler, filtre sterilizasyonu amacıyla, yaklaşık 0.3 mikronun altında boyutlandırıldığında daha kolay bir şekilde boyutlandırılır. C_{10} ila C_{20} aralığında karbon zincir uzunluklarına sahip doymamış yağlı asitleri içeren katyonik lipitler tercih edilir. Diğer yapı iskeleleri de aynı zamanda amino grubunu (örneğin, katyonik lipidin amino grubu) ve yağlı asit ya da katyonik lipidin yağlı alkil kısmının ayrılması için kullanılabilir. Uygun yapı iskeleleri, teknikte uzman kişilerce bilinir.

Bazı düzenlemelerde, katyonik lipitler, en az bir protonlanabilir ya da protondan arındırılabilen gruba sahiptir, öyle ki lipit, bir fizyolojik pH'ın (pH 7.4) altında ya da bu pH'ta olan bir pH'ta pozitif olarak yüklenir ve ikinci bir pH'ta, tercih edilen şekliyle fizyolojik pH'ın üstünde ya da bu pH'ta nötr olabilir. Bu tür lipitler aynı zamanda katyonik lipitler olarak da adlandırılır. Elbette, pH'ın bir fonksiyonu olarak protonların eklenmesi ya da çıkarılmasının, bir denge prosesi olduğu ve bir yüklü ya da nötr lipide referansın baskın türlerin doğasını ifade ettiği anlaşılacaktır ve tüm lipitlerin yüklü ya da nötr formda mevcut olmasını gerektirmez. Birden fazla protonlanabilir ya da protondan arındırılabilir gruba sahip lipitler ya da zwitteriyonik olanlar da aynı zamanda bunun dışında tutulmamaktadır.

Bazı düzenlemelerde, protonlanabilir lipitler (yani, katyonik lipitler), yaklaşık 4 ila yaklaşık 11 aralığında protonlanabilir grubun bir pKa'sına sahiptir. En çok tercih edilen, yaklaşık 4 ila yaklaşık 7 arasındaki pKA'dır, çünkü bu lipitler düşük bir pH formülasyonu safhasında katyonik olacakken, partiküllerin yüzeyi pH 7.4 civarındaki bir fizyolojik pH'ta geniş bir şekilde (tamamen olmasa da) nötralize olacaktır. Bu pKA'nın faydalarından biri, partikülün dış yüzeyi ile ilişkili olan en azından bazı nükleik asitlerin fizyolojik pH'ta elektrostatik etkileşimini kaybedecek olması ve basit diyaliz ile giderilebilecek olmasıdır; böylece partikülün kürense olan hassasiyeti büyük ölçüde azaltılır.

Oluşum sırasında partiküllerin toplanmasını azaltan lipitlere dair örnekler, (U.S. Pat. No. 6,320,017 sayılı belgede tarif edilen) gibi polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş lipitler, monosialogangliosid Gm 1 ve poliamid oligomerleri ("PAO") içerir. PEG, Gm 1 ya da ATTA benzeri formülasyon sırasında toplanmayı önleyen yüksüz, hidrofilik, sterik bariyerli kısımlara sahip diğer bileşikler aynı zamanda, burada tarif edilen yöntemler ve kompozisyonlardaki gibi kullanılmak üzere lipitlere de bağlanabilir. ATTA- lipitleri, örneğin, U.S. Patent No. 6,320,017 sayılı belgede tarif edilmektedir ve PEG- lipit konjügatları, örneğin, U.S. Patent No'lar. 5,820,873, 5,534,499 ve 5,885,613 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Tipik olarak, agregasyonu azaltmak için seçilen lipit bileşeninin konsantrasyonu yaklaşık % 1 ila % 15 arasındadır (lipitlerin mol yüzdesi cinsinden).

Toplanmayı azaltan ve / veya karaciğer izleme modelinde kullanılabilen nükleik asit ajanlarına konjügasyon için uygulan olan lipitlerin örnekleri, (U.S. Pat. No. 6,320,017 sayılı belgede tarif edilen) gibi polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş lipitler,

monosialogangliosid Gm 1 ve poliamid oligomerleri ("PAO") içerir. PEG, Gm 1 ya da ATTA benzeri formülasyon sırasında toplanmayı önleyen yüksüz, hidrofilik, sterik bariyerli kısımlara sahip diğer bileşikler aynı zamanda, burada tarif edilen yöntemler ve kompozisyonlardaki gibi kullanılmak üzere lipitlere de bağlanabilir. ATTA- lipitleri, örneğin, U.S. Patent No. 6,320,017 sayılı belgede tarif edilmektedir ve PEG- lipit konjügatları, örneğin, U.S. Patent No'lar. 5,820,873, 5,534,499 ve 5,885,613 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Tipik olarak, agregasyonu azaltmak için seçilen lipit bileşeninin konsantrasyonu yaklaşık % 1 ila % 15 arasındadır (lipitlerin mol yüzdesi ile cinsinden).

Bunun içinde kullanılan PEG ile modifiye edilmiş lipitlere ait (ya da lipit- polioksietilen konjügatları) spesifik örnekler, PEG bölümünü lipit vezikül yüzeyine sabitlemek için çeşitli "bağlayan" lipit kısımlarına sahip olabilir. Uygun PEG ile modifiye edilmiş lipitlerin örnekleri, PEG ile modifiye edilmiş fosfatidiletanolamin ve fosfatidik asit, beraber inceleme sürecindeki USSN 08 / 486,214 sayılı belgede tarif edilen PEG- seramid konjügatları (örneğin, PEG- CerC14 ya da PEG- CerC20), PEG ile modifiye edilmiş di alkilaminler ve PEG ile modifiye edilmiş 1,2- diasiloksipropan- 3- aminleri içerir. Özellikle tercih edilenler PEG ile modifiye edilmiş diasilgliseroller ve di alkilgliserollerdir. Bazı düzenlemelerde, bir partikül içindeki PEG limitlerinin toplam mol yüzdesi (%) yaklaşık % 1.5 moldür. Örneğin, partikül yukarıda tarif edilen gibi bir PEG ile modifiye edilmiş bir lipit gibi burada tarif edilen çok sayıda PEG lipidi ve bir PEG ihtiva eden bir hedefleme lipidi içerdiğinde, PEG ihtiva eden lipitlerin toplam miktarı birlikte alındığında yaklaşık % 1.5 moldür.

PEG ya da ATTA gibi sterikal olarak büyük bir kısmın bir lipit bağına konjuge edildiği düzenlemelerde, lipit bağının seçimi, konjugatın lipit partikülü ile ne tür bir ilişkisi olması gerektiğine bağlıdır. mPEG (mw2000)- diastearoilfosfatidiletanolamin'in (PEG- DSPE), partikülün dolaşımdan temizlenene kadar, muhtemelen günlerce, bir lipozom ile ilişkili kalacağı iyi bilinmektedir. PEG- CerC20 gibi diğer konjugatlar, benzer kalma kapasitesine sahiptir. PEG- CerC14, bununla birlikte, bazı analizlerde, 60 dakikadan daha düşük bir $T_{1/2}$ ile, seruma temas üzerine formülasyonun dışında hızlı bir şekilde değişmektedir. U.S. Pat. Başvuru SN 08 / 486,214 sayılı belgede gösterildiği üzere, en az üç özellik, değişim oranını etkiler: asil zincirinin uzunluğu, asil zincirinin doygunluğu, ve sterik bariyer baş grubunun büyüklüğü. Bu özelliklerin uygun varyasyonlarına sahip olan bileşikler bunun içinde faydalı olabilir. Bazı terapötik uygulamalar için PEG ile

modifiye edilmiş lipitin, nükleik asit- lipit partikülünden in vivo olarak hızlı bir şekilde kaybolması tercih edilebilir ve dolayısıyla PEG ile modifiye edilmiş lipit nispeten kısa lipit bağlarına sahip olacaktır. Diğer terapötik uygulamalarda, nükleik asit- lipit partiküllerinin daha uzun bir plazma dolaşım ömrüne sahip olması tercih edilebilir ve dolayısıyla PEG ile modifiye edilmiş lipit nispeten daha uzun lipit bağlarına sahip olacaktır. Örnek niteliğindeki lipit bağları, yaklaşık C_{14} ila yaklaşık C_{22} arasında, tercih edilen şekliyle yaklaşık C_{14} ila yaklaşık C_{16} arasında uzunluklara sahip olanları içerir. Bazı düzenlemelerde, bir PEG parçası, örneğin bir mPEG- NH_2, yaklaşık 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 ya da 20000 daltonluk bir boyuta sahiptir.

Toplanmayı önleyen bileşiklerin düzgün bir şekilde işlev görmesi için lipit konjugasyonu gerektirmediğine dikkat edilmelidir. Çözeltide serbest PEG ya da serbest ATTA, toplanmayı önlemek için yeterli olabilir. Partiküller formülasyondan sonra stabil olursa, PEG ya da ATTA bir deneğe uygulamadan önce dışarı diyaliz edilebilir.

Nötr lipitler, lipit partikülü içinde mevcut olduğunda, fizyolojik pH'ta ya yüklenmemiş ya da nötr bir zwitteriyonik formda mevcut olan bir dizi lipit türünden herhangi biri olabilir. Bu tür lipitler, örneğin, diasilfosfatidilkolin, diasilfosfatidiletanolamin, seramid, sfingomiyelin, dihidrosfingomiyelin, sefalin ve serebrosid içerir. Burada tarif edilen partiküllerde kullanılması için nötr lipitlerin seçimi genellikle, örneğin kan dolaşımındaki lipozomların stabilitesinin ve lipozom boyutunun göz önüne alınmasıyla yönlendirilir. Tercih edilen şekliyle, nötr lipit bileşeni, iki asil grubuna (yani diasilfosfatidilkolin ve diasilfosfatidiletanolamin) sahip bir lipittir. Değişen zincir uzunluklarına ve doyma derecesinde çeşitli asil zincir gruplarına sahip lipitler mevcuttur ya da izole edilebilir ya da iyi bilinen teknikler ile sentezlenebilir. Uygulamaların bir grubunda, C_{14} ila C_{22} aralığında karbon zinciri uzunluklarına sahip doymuş yağlı asitleri içeren lipitler tercih edilmektedir. Uygulamaların başka bir grubunda, C_{14} ila C_{22} aralığında karbon zinciri uzunluklarına sahip mono ya da ikili doymamış yağlı asitler ile lipitler kullanılmaktadır. Buna ilaveten, doymuş ve doymamış yağlı asit zincirlerinin karışımlarına sahip lipitler kullanılabilmektedir. Tercih edilen şekliyle, burada kullanılan nötr lipitler, DOPE, DSPC, POPC, DPPC ya da herhangi bir ilgili fosfatidilkolin'dir. Burada yararlanılan nötr lipitler aynı zamanda sfingomiyelin, dihidrosfingomiyelin ya da serin ve inositol gibi diğer baş gruplara sahip fosfolipitlerden oluşabilir.

Lipit karışımının sterol bileşeni, mevcut olduğunda, lipozom, lipid vezikül ya da lipit partikül preparasyonu alanında konvansiyonel olarak kullanılan sterollerden herhangi biri olabilir. Tercih edilen bir sterol, kolesteroldür.

Yukarıda özellikle tarif edilenlere ilaveten, yaklaşık fizyolojik pH'ta net pozitif yük taşıyan diğer katyonik lipitler de burada tarif edilen lipit partiküllerine dahil edilebilir. Bu tür katyonik lipitler, N,N- dioleil- N,N- dimetilamonyum klorür ("DODAC"); N- (2,3- dioleiloksi) propil- N,N- N- trietilamonyum klorür ("DOTMA"); N,N- distearil- N,N- dimetilamonyum bromür ("DDAB"); N- (2,3- dioleoiloksi) propil)- N,N,N- trimetilamonyum klorür ("DOTAP"); 1,2- Dioleiloksi- 3- trimetilaminopropan klorür tuzu ("DOTAP.Cl"); 3β- (N- (N',N'- dimetilaminoetan)- karbamoil) kolesterol ("DC- Kol"), N- (1 (2,3- dioleiloksi) propil)- N- 2- (sperminkarboksamido) etil)- N,N- dimetilamonyum triflorasetat ("DOSPA"), dioktadesilamidoglisil karboksispermin ("DOGS"), 1,2- dileoil- sn- 3- fosfoetanolamin ("DOPE"), 1,2- dioleoil- 3- dimetilamonyum propan ("DODAP"), N,N- dimetil- 2,3- dioleyloksi) propilamin ("DODMA"), ve N- (1,2- dimiristiloksiprop- 3- il)- N,N- dimetil- N- hidroksietil amonyum bromür ("DMRIE") içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Buna ilaveten, katyonik lipitlerin bir dizi ticari preparasyonları kullanılabilir, örneğin, LIPOFECTIN (DOTMA ve DOPE dahil olmak üzere, GIBCO / BRL firmasından temin edilen), ve LIPOFECTAMINE (DOSPA ve DOPE içeren, GIBCO / BRL firmasından temin edilen) gibi. Belirli uygulamalarda, bir katyonik lipit bir amino lipitdir.

Burada tarif edilen lipit partiküllerde kullanılması için uygun anyonik lipitler, fosfatidilgliserol, kardiyoliçin, diasilfosfatidilserin, diasilfosfatidik asit, N- dodesekanoil fosfatidiletanoloamin, N- süksinil fosfatidiletanolamin, N- glutaril fosfatidiletanolamin, lisilfosfatidilgliserol ve nötr lipitlere katılan diğer anyonik modifiye edici grupları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Birçok düzenlemede, amfipatik lipitler, burada tarif edilen lipit partiküllere dahil edilir. "Amfipatik lipitler", herhangi uygun materyal anlamına gelmekte olup, burada lipit materyalinin hidrofobik kısmı hidrofobik faza yönelirken hidrofilik kısım sulu faza yönelir. Bu tür bileşikler, fosfolipidler, aminolipitler ve sfingolipidleri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Temsilci fosfolipitler, sfingomiyelin, fosfatidilolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidik asit, palmitoiloleoil fosfatidilolin, lisofosfatidilolin, lisofosfatidieltanolamin, dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), dioleoilfosfatidilkolin (DOPC), distearoilfosfatidilkolin (DSPC), dimiristoilfosfatidil kolin

(DMPC) ya da dilinoleoilfosfatidilkolin (DLPC) içerir. Örneğin sfingolipidler, glikosifingolipid aileleri, diasilgliseroller, ve β- asiloksiasitler gibi diğer fosfordan yoksun bileşikler de kullanılabilir. Buna ilaveten, bu tür amfipatik lipitler, trigliseridler ve steroller gibi diğer lipitler ile kolayca karıştırılabilir.

Burada tarif edilen lipit partikülleri içine dahil edilmek için de uygun olanlar aynı zamanda, programlanabilir füzyon lipitleridir. Bu tür lipit partikülleri, hücre membranları ile kaynaşmaya az eğilim göstermekte ve belirli bir sinyal olayı oluşana kadar yüklerini iletmektedir. Bu, lipit partikülünün, hücreler ile kaynaşmaya başlamadan önce bir organizma içerisine ya da hastalık bölgesine enjeksiyondan sonra daha eşit bir şekilde dağılmasına olanak sağlar. Sinyal olayı, örneğin, pH, sıcaklık, iyonik ortam, ya da zamanda bir değişiklik olabilir. Sonraki durumda, bir ATTA- lipit konjügatı ya da bir PEG- lipit konjügatı gibi bir füzyon geciktirici ya da "gizleme" bileşeni, zaman içinde lipit partikül membranından kolaylıkla değişebilir. Örnek niteliğindeki lipit bağları, yaklaşık C_{14} ila yaklaşık C_{22} arasında, tercih edilen şekliyle yaklaşık C_{14} ila yaklaşık C_{16} arasında uzunluklara sahip olanları içerir. Bazı düzenlemelerde, bir PEG parçası, örneğin bir mPEG- NH_2, yaklaşık 1000, 2000, 5000, 10000, 15000 ya da 20000 daltonluk bir boyuta sahiptir.

Lipid partikülü vücutta uygun bir şekilde dağıtıldığı zaman, füzojenik olacak şekilde yeterli gizleme ajanını kaybetmiştir. Diğer sinyal olayları ile, iltihaplı bir bölgedeki artan sıcaklık gibi hastalık bölgesi ya da hedef hücresi ile ilişkili olan bir sinyalin seçilmesi arzu edilir.

Bir nükleik aside konjüge edilmiş bir lipit partikülü ayrıca bir hedefleme parçası, örneğin, bir hücre tipine ya da dokuya özgü bir hedefleme parçası içerebilir. Ligandlar, hücre yüzeyi reseptörleri, glikoproteinler, vitaminler (örneğin, riboflavin) ve monoklonal antikorlar gibi çeşitli hedefleme parçaları kullanılarak lipit partiküllerinin hedeflenmesi daha önce tarif edilmiştir (bakınız, örneğin, U.S. Patent No'lar. 4,957,773 ve 4,603,044 sayılı belgeler). Örnek niteliğindeki hedefleme parçaları, burada tarif edilen bir hedefleme lipidi gibi bir hedefleme lipidi içerir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi Ga1Nac3- DSG ve Ga1NAc3- PEG- DSG gibi burada tarif edilen şekilde hedefleme lipidi içeren bir Ga1NAc'dir. Hedefleme parçaları, proteinin tamamını ya da bunun fragmanlarını içerebilir. Hedefleme mekanizmaları genellikle hedefleme ajanlarının, hedef kısmı ile örneğin bir hücre yüzey reseptörü olan hedefle etkileşime girmesi için uygun olacak şekilde, lipid partikülünün yüzeyi üzerinde konumlandırılmasını gerektirir.

Çeşitli farklı hedefleme ajanları ve yöntemler, örneğin Sapra, P. ve Ailen, TM, Prog. Lipid Res. 42(5): 439- 62 (2003); ve Abra, RM ve diğ., J. Liposome Res. 12: 1- 3, (2002) sayılı belgelere tarif edilmiş olanlar da dahil olmak üzere teknikte bilinmektedir ve hali hazırda bulunmaktadır.

Hedefleme için, polietilen glikol (PEG) zincirleri gibi hidrofilik polimer zincirlerinin yüzey kaplaması ile lipid partikülleri, yani, lipozomların kullanılması önerilmiştir (Ailen, ve diğ., Biochimica et Biophysica Acta 1237 : 99- 108 (1995); DeFrees, ve diğ., Journal of the American Chemistry Society 118: 6101- 6104 (1996); Blume, ve diğ, Biochimica et Biophysica Açta 1149: 180- 184 (1993); Klibanov, ve diğ., Journal of Liposome Research 2: 321- 334 (1992); U.S. Patent No. 5,013556; Zalipsky, Bioconjugate Chemistry 4: 296- 299 (1993); Zalipsky, FEBS Letters 353: 71- 74 (1994); Zalipsky, Stealth Liposomes içindeki Bölüm 9 (Lasic ve Martin, Editörler) CRC Press, Boca Raton Fİ (1995) sayılı belgeler). Bir yaklaşımda, lipit partikülü hedeflemeye yönelik bir antikor gibi bir ligand, lipit partikülünü oluşturan lipitlerin polar baş grubuna bağlanır. Başka bir yaklaşımda, hedefleme ligandı, hidrofilik polimer kaplamayı oluşturan PEG zincirlerinin distal uçlarına bağlanır (Klibanov, ve diğ., Journal of Liposome Research 2: 321- 334 (1992); Kirpotin ve diğ., FEBS Letters 388: 115- 118 (1996) sayılı belgeler).

Hedef ajanların bağlanması için standart yöntemler kullanılabilir. Örneğin, hedef ajanların eklenmesi için aktive edilebilecek olan, fosfatidiletanolamin ya da lipit ile türetilmiş bleomisin gibi türetilmiş lipofilik bileşikler kullanılabilir. Antikor- hedefli lipozomlar, örneğin, protein A'yı içeren lipozomlar kullanılarak oluşturulabilir (bakınız, Renneisen, ve diğ.,J. Bio. Chem., 265: 16337- 16342 (1990) ve Leonetti, ve diğ., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87: 2448- 2451 (1990)). Antikor konjügasyonuna ait diğer örnekler, U.S. Patent No. 6,027,726 sayılı belgede açıklanmıştır. Hedefleme parçalarına ait örnekler de aynı zamanda neoplazmalar ya da tümörler ile ilişkili antijenler dahil olmak üzere, hücresel bileşenlere özgü olan diğer proteinleri içerir. Hedefleme parçaları olarak kullanılan proteinler, kovalent bağlar vasıtasıyla lipozomlara bağlanabilir (bakınız, Covalent Attachment of Proteins to Liposomes, 149 Methods in Enzymology 111- 119 (Academic Press, Inc. 1987) sayılı belge). Diğer hedefleme metotları, biyotin- avidin sistemini içerir.

Örnek teşkil eden bir düzenlemede, lipit partikülü mevcut buluşa ait katyonik bir lipit, nötr lipidler (katyonik lipitden başka), bir sterol (örneğin, kolesterol) ve PEG ile modifiye edilmiş bir lipidin (örneğin, bir PEG- DMG ya da PEG- DMA) bir karışımını ihtiva eder.

Bazı uygulamalarda, lipit karışımı, mevcut buluşa ait bir katyonik lipit, bir nötr lipit, kolesterol ve bir PEG ile modifiye edilmiş lipitden oluşur ya da temel olarak bunlardan oluşur. Tercih edilen başka uygulamalarda, lipit partikülü, yaklaşık % 20- 70 DLin- M- C3- DMA: : % 5- 45 nötr lipit: % 20- 55 kolesterol: % 0.5- 15 PEG ile modifiye edilmiş lipitin molar oranlarında, yukarıdaki lipit karışımından oluşur ya da temel olarak bunlardan oluşur.

Özel düzenlemelerde, lipit partikülü DLin- M- C3- DMA, DSPC, Kol ve ya PEG- DMG ya da PEG- cDMA'dan, örneğin molar oranı olarak yaklaşık % 20- 60 DLin- M- C3- DMA : % 5- 25 DSPC : % 25- 55 Kol : % 0.5- 15 PEG- DMG yada PEG- cDMA'dan oluşur ya da temel olarak bunlardan oluşur. Özel düzenlemelerde, molar lipit oranı yaklaşık olarak 40 / 10 / 40 / 10 (% mol DLin- M- C3- DMA / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA), 35 / 15 / 40 / 10 (% mol DLin- M- C3- DMA / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da cPEG- DMA) ya da 52 / 13 / 30 / 5 (% mol DLin- M- C3- DMA / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- DMA) olmaktadır.

Uygulamaların başka bir grubunda, bu kompozisyonlardaki nötr lipit, DSPC, POPC, DPPC, DOPE ya da SM ile değiştirilir.

Terapötik Ajan- Lipit Partikülü Kompozisyonları ve Formülasyonları

Burada tarif edilenler, burada tarif edilen bir lipit partikülü ve bir aktif ajanı içeren kompozisyonlar olup, bahsedilen aktif ajan, lipit partikülü ile ilişkilidir. Belirli düzenlemelerde, aktif ajan, bir terapötik ajandır. Belirli düzenlemelerde, aktif ajan lipit partikülünün sulu bir iç kısmı içerisinde kapsüllenmiştir. Diğer düzenlemelerde, aktif ajan, lipit partikülün bir ya da daha fazla olan lipit katmanları içerisinde bulunur. Diğer düzenlemelerde, aktif ajan bir lipit partikülünün dış ya da iç lipit yüzeyine bağlanır.

Burada kullanıldığı şekliyle "tamamen kapsüllenmiş" ifadesi, partiküllerin içinde bulunan nükleik asidin, seruma ya da serbest DNA'ları büyük ölçüde parçalayacak bir nükleaz analizine maruz kaldıktan sonra büyük ölçüde bozulmadığını belirtir. Tamamen kapsüllenmiş bir sistemde, tercih edilen şekliyle % 25'ten daha az nükleik asit partikülü, normal olarak % 100 serbest nükleik asiti bozacak olan bir tedavide bozunmuştur, daha fazla tercih edilen şekliyle % 10'dan az ve en çok tercih edilen şekliyle % 5'inden az olan nükleik asit bir tedavide bozunmuştur. Alternatif olarak, tamamen enkapsülasyon, bir Oligreen® analizi tarafından tespit edilebilir. Oligreen®, oligonükleotidleri ve solüsyondaki tek sarmallı DNA'yı (Invitrogen Corporation,

Carlsbad, CA firmasından temin edilebilir) nicelleştirmek için ultra duyarlı bir floresan nükleik asit boyasıdır. Tamamen enkapsüllenme aynı zamanda partiküllerin serum içinde stabil olduğunu, yani in vivo şeklinde uygulama üzerine bileşen parçalarına hızlı bir şekilde ayrılmadıklarını gösterir.

Aktif ajanlar, burada kullanıldıkları şekliyle, bir hücre, doku, organ, ya da denek üzerinde istenen bir etkiyi uygulayabilme kapasitesine sahip herhangi bir molekül ya da bileşiği içerir. Bu tür etkiler örneğin biyolojik, fizyolojik ya da kozmetik olabilir. Aktif ajanlar, örneğin, nükleik asitler, peptidler ve polipeptidler dahil olmak üzere, örneğin, poliklonal antikorlar, monoklonal antikorlar, antikor fragmanları gibi antikorlar; insanlaştırılmış antikorlar, rekombinant antikorlar, rekombinant insan antikorları ve Primatized ™ antikorları, sitokinler, büyüme faktörleri, apoptotik faktörler, farklılaşma indükleyici faktörler, hücre yüzeyi reseptörleri ve bunların ligandları; hormonlar; ve küçük organik moleküller ya da bileşikler dahil olmak üzere küçük molekülleri içerecek şekilde molekül ya da bileşiğin herhangi bir türü olabilir.

Bir düzenlemede, aktif ajan bir terapötik ajan, ya da bunların bir tuzu ya da türevidir. Terapötik ajan türevleri, terapötik olarak kendiliğinden aktif olabilirler ya da ayrıca modifikasyon üzerine aktif hale gelen ön ilaçlar olabilirler. Ayrıca, bir düzenlemede, bir terapötik ajan türevi terapötik aktiviteyi modifiye edilmemiş ajana kıyasla bir ölçüde korurken diğer bir uygulamada ise bir terapötik ajan türevi, terapötik aktivitesinden yoksundur.

Çeşitli uygulamalarda, terapötik ajanlar, anti- enflamatuar bileşikler, anti- depresanlar, uyarıcılar, analjezikler, antibiyotikler, doğum kontrol ilaçları, antipiretikler, vazodilatatörler, anti- anjiyogenikler, sitovasküler ajanlar, sinyal transdüksiyon, inhibitörleri, kardiyovasküler ilaçlar, örneğin, anti- aritmik ajanlar, vazokonstriktörler, hormonlar ve steroidler gibi herhangi terapötik olarak etkili ajan ya da ilacı içerir.

Tarifnameye göre kullanılabilecek onkoloji Haplarının örnekleri, ancak sınırlandırılmamış olarak, adriamisin, alkeran, allopurinol, altretamin, amifostin, anastrozol, araC, arsenik trioksit, azatioprin, beksaroten, biCNU, bleomisin, busulfan intravenöz, busulfan oral, kapesitabin (Xeloda), karboplatin, karmustin, CCNU, selekoksib, klorambusil, sisplatin, kladribin, siklosporin A, sitarabin, sitozin arabinosid, daunorubisin, sitoksan, daunorubisin, deksametazon, deksrazoksan, dodetaksel, doksorubisin, doksorubisin, DTIC, epirubisin, estramustin, etoposid fosfat,

etoposid ve VP- 16, eksemestan, FK506 fludarabin, florouracil, 5- FU, gemsitabin (Gemzar), gemtuzumab- ozogarnicin, goserelin asetat, hidrea, hidroksiüre, idarubisin, ifosfamid, imatinib mesilat, interferon, irinotekan (Camptostar, CPT- 111), letrozol, lökovorin, löstatin, löprolid, levamisol, litretinoin, megastrol, melfalan, L- PAM, mesna, metotreksat, metoksalen, mitramisin, mitomisin, mitoksantron, azot hardalı, paklitaksel, pamidronat, Pegademaz, pentostatin, porfimer sodyum, prednizon, rituksan, streptozosin, STI- 571, tamoksifen, taksoter, temozolamid, teniposid, VM- 26, topotekan (Hycamtin), toremifen, tretinoin, ATRA, valrubisin, velban, vinblastin, vinkristin VP 16 ve vinorelbin içerir. Kullanılabilecek diğer onkoloji ilacı örnekleri, eliptisin ve eliptisin analogları ya da türevleri, epotilonlar, hücre içi kinaz inhibitörleri ve kamptotesindir.

Nükleik Asit- Lipit Partikülleri

Bazı düzenlemelerde, burada tarif edilen lipit partikülleri, bir nükleik asit lipit partikülünde elde edilen bir nükleik asit ile birliktedir. Belirli düzenlemelerde, nükleik asit lipit partikülü içinde tamamen enkapsüllenmiştir. Burada kullanıldığı şekliyle, "nükleik asit" terimi, herhangi oligonükleotid ya da polinükleotidi içerdiği anlamına gelir. 50 nükleotide kadarını içeren fragmanlar genel olarak oligonükleotidler olarak tanımlanır ve uzun fragmentler, polinükleotidler olarak adlandırılır. Belirli düzenlemelerde, burada tarif edilen oligonükleotidler uzunlukça 20- 50 nükleotidlerdir.

Bu buluş bağlamında, "polinükleotid" ve "oligonükleotid" terimleri, doğal olarak oluşan bazlar, şekerler ve iç şeker (omurga) bağlarından oluşan nükleotid ya da nükleosid monomerlerinin bir polimer ya da oligomeri anlamına gelmektedir. "Polinükleotid" ve "oligonükleotid" terimleri aynı zamanda benzer şekilde işlev gören doğal olarak oluşmayan monomerleri veya bunların kısımlarını içeren polimerleri ya da oligomerleri kapsamaktadır. Bu tür modifiye edilmiş ya da ikame edilmiş oligonükleotidler, örneğin nükleazların mevcudiyetinde artırılmış stabilite ve artan hücresel geri alımı gibi özelliklerden dolayı genellikle doğal formlar üzerinde tercih edilir.

Oligonükleotitler, deoksiribooligonükleotitler ya da ribonükleotitler olarak sınıflandırılır. Bir deoksiribooligonükleotit, deoksiriboz olarak adlandırılan, değişen, dallanmamış bir polimer oluşturmak için bu şekerin 5' ve 3' karbonunda fosfata kovalent olarak bağlanan 5- karbon şekerinden oluşur. Bir ribooligonükleotit ise, 5- karbon şekerinin riboz olduğu yerde benzer bir tekrarlayan yapıdan oluşur.

Burada tarif edilen bir lipit- nükleik asit partikülünde mevcut olan nükleik asit, bilinen herhangi bir nükleik asit formunu içerir. Burada kullanılan nükleik asitler, tek sarmallı DNA ya da RNA ya da çift sarmallı DNA ya da RNA ya da DNA- RNA hibridleri olabilir, çift sarmallı DNA örnekleri, yapısal genleri, kontrol ve sonlandırma bölgeleri dahil olmak üzere genleri ve viral ya da plazmid DNA gibi kendi kendini kopyalayan sistemleri içerir. Çift sarmallı RNA örnekleri, siRNA ve diğer RNA interferans reajanları içerir. Tek sarmallı nükleik asitler, antisens oligonükleotidler, ribozimler, mikroRNA ve tripleks oluşturan oligonükleotidleri içerir.

Burada tarif edilen nükleik asitler, genel olarak nükleik asidin belirli formuna bağlı olarak çeşitli uzunluklarda olabilir. Örneğin, belirli düzenlemelerde, plazmidler ya da genler, yaklaşık 1,000 ila 100,000 arasında uzunluğa sahip nükleotid kalıntılar olabilir. Özel düzenlemelerde, oligonükleotidler yaklaşık 10 ila 100 nükleotid uzunluğunda olabilir. Çeşitli ilgili uygulamalarda, oligonükleotidler, hem tek sarmallı, çift sarmallı hem de üç sarmallı olarak, yaklaşık 10 ila yaklaşık 50 nükleotid arasında, yaklaşık 20 ila yaklaşık 50 nükleotid arasında, yaklaşık 15 ila yaklaşık 30 nükleotid arasında, yaklaşık 20 ila 30 nükleotid arasında uzunlukta olabilir.

Belirli uygulamalarda, burada tarif edilen oligonükleotid (ya da bunların bir sarmal) özellikle bir hedef polinükleotide hidritleşir ya da bir hedef polinükleotide tamamlayıcıdır. "Spesifik olarak hibritlenebilir" ve "tamamlayıcı", DNA ya da RNA hedef ve oligonükleotid arasında stabil ve spesifik bağlanmanın gerçekleşeceği şekilde yeterli bir tamamlayıcılık derecesini belirtmek için kullanılan terimlerdir. Bir oligonükleotidin, spesifik olarak hibritlenebilir olabilmesi için kendi hedef nükleik asit sekansına % 100 tamamlayıcı olması gerekmediği anlaşılmaktadır. Bir oligonükleotid, oligonükleotidin hedefe bağlanması, buradaki fayda ya da ifadesinin kaybına neden olmak için hedef molekülün normal fonksiyonu ile etkileşime girdiğinde spesifik olarak hibritlenebilir ve spesifik bağlanmanın istendiği koşullar altında, yani, in vivo olarak analizler ya da terapötik tedavi durumunda fizyolojik koşullar altında, ya da deneylerin yürütüldüğü koşullar altında, in vitro olarak deneyler durumunda fizyolojik koşullar altında oligonükleotidin hedef olmayan sekanslara spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için yeterli derecede tamamlayıcılık bulunmaktadır. Böylece, diğer uygulamalarda, bu oligonükleotid, spesifik olarak hibridize ettiği ya da hedeflendiği bir gen ya da mRNA sekansının bölgesine kıyaslandığı üzere, örneğin uyumsuz eşleşmeler gibi, 1, 2 ya da 3 baz ikameleri içerir.

RNA İnterferans Nükleik Asitler

Özel düzenlemelerde, burada tarif edilen nükleik asit- lipit partikülleri, RNA interferans (RNAi) molekülleri ile ilişkilidir. RNAi moleküllerini kullanan RNA interferans yöntemleri ilgili bir gen ya da polinükleotid ifadesini bozmak için kullanılabilir. Küçük müdahale edici RNA (siRNA) esas olarak, geliştirilme altında hedeflenmiş oligonükleotid ilaçların bir sonraki jenerasyonu olarak antisens ODN ve ribozimlerin yerini almıştır. SiRNA'lar, RNAi kaynaklı susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen bir sitoplazmik multi- protein kompleksi ile ilişkilendirilebilen normal olarak 21- 30 nükleotid uzunluğundaki RNA dubleksleridir. siRNA ile yüklenmiş RISC, homolog mRNA transkriptlerinin bozulmasına aracılık eder, bu nedenle siRNA, protein ekspresyonunu yüksek spesifite ile yıkmak üzere tasarlanabilir. Diğer antisens teknolojilerinden farklı olarak, siRNA, kodlama olmayan RNA yoluyla gen ifadesini kontrol etmek için doğal bir mekanizma doğrultusunda işlev görür. Bu durum, genellikle aktivitelerinin in vitro ve in vivo şeklinde ya antisens ODN ya da ribozimlerden daha etkin olmasının nedeni olarak kabul edilir. Klinik olarak ilgili hedefleri hedefleyen siRNA'lar dahil olmak üzere çeşitli RNAi ayıraçları, günümüzde, Fougerolles, A. ve diğ., Nature Reviews 6: 443- 453 (2007) sayılı belgede tarif edildiği gibi farmasötik gelişme altındadır.

İlk tarif edilen RNAi molekülleri, hem bir RNA sens hem de RNA antisens sarmallarını içeren RNA: RNA hibritleri olmuş iken, şimdi DNA sens: RNA antisens hibritleri, RNA sens: DNA antisens hibritleri ve DNA: DNA hibritlerinin, RNAi'ya aracılık edebildiği gösterilmiştir (Lamberton, J.S. ve Christian, A.T., (2003) Molecular Biotechnology 24: 111- 119 sayılı belge). Dolayısıyla, burada, bu farklı tipteki çift- sarmallı moleküllerden herhangi birini içeren RNAi moleküllerin kullanımı ihtiva edilir. Buna ilaveten, RNAi moleküllerin çeşitli formlar halinde hücrelere dahil edilebileceği ve kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Buna bağlı olarak, burada kullanıldığı şekliyle, RNAi molekülleri, iki farklı sarmalları, yani bir sens sarmalı ve bir antisens sarmalı, içeren çift sarmallı oligonükleotidleri, örneğin küçük müdahale edici RNA (siRNA); nükleotidil olmayan bağlayıcı ile birlikte bağlanan iki farklı sarmalları içeren çift- sarmallı oligonükleotidi; örneğin, shRNAi molekülleri gibi, bir çift- sarmallı bölgeyi oluşturan tamamlayıcı sekansların saç tokası ilmeğini içeren oligonükleotidleri ve bir başka polinükleotid ile kombinasyon halinde ya da tek başına bir çift sarmallı polinükleotidi oluşturabilen bir ya da daha fazla polinükleotidi ifade eden ifade vektörleri de dahil olmak üzere

hücrelerde bir RNAi yanıtını tetikleyebilen herhangi birini ve tüm molekülleri içerir, ancak bunlarla sınırlı tutulamaz.

Burada kullanıldığı şekliyle, bir "tek sarmallı siRNA bileşiği", bir tek molekülden yapılan bir siRNA bileşiğidir. Örneğin, bir saç tokası ya da tava sapı yapısı olabilen ya da içerebilen, intra- sarmal eşleşmesi ile oluşturulan bir dubleks bölgeyi içerebilir. Tek sarmallı siRNA, hedef molekülüne göre antisens olabilir.

Bir tek sarmallı siRNA bileşiği, RISC'ye girebilecek ve bir hedef mRNA'nın RISC aracılı bölünmesine katılabilecek kadar uzun olabilir. Bir tek sarmallı siRNA bileşiği en az 14 ve diğer düzenlemelerde, en az 15, 20, 25, 29, 35, 40 ya da 50 nükleotid uzunluğundadır. Bazı düzenlemelerde, 200, 100, ya da 60'dan daha az nükleotid uzunluğundadır.

Saç tokası yapısı siRNA bileşikleri, en az 17, 18, 19, 29, 21,22, 23, 24, ya da 25 nükleotid çiftine eşittir ya da bunların bir dubleks bölgesine sahip olacaktır. Dubleks bölge, belki de uzunlukça 200, 100, ya da 50'ye eşit ya da daha az bir uzunlukta olabilir. Bazı düzenlemelerde, dubleks bölge için aralıklar, 15- 30, 17 ila 23, 19 ila 23 ve 19 ila 21 nükleotid çiftleri uzunluğundadır. Saç tokası yapısı, tek sarmallı bir çıkıntıya ya da terminal çiftlenmemiş bölgeye sahiptir. Bazı düzenlemelerde, çıkıntılar 2- 3 nükleotid uzunluğundadır. Bazı düzenlemelerde, çıkıntı saç tokası yapısının sens tarafındadır ve bazı uygulamalarda saç tokası yapısının antisensi üzerindedir.

Burada kullanıldığı şekliyle bir "çift sarmallı siRNA bileşik", burada zincirler arası hibridizasyonunun bir dubleks yapısının bir bölgesini oluşturabilen birden fazla ve bazı durumlarda ikisini içeren bir siRNA'dır.

Çift sarmallı siRNA bileşiğinin antisens sarmalı, uzunlukça en az 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40, ya da 60 nükleotittir ya da bunlara eşit olabilir. Belki de, 200, 100, ya da 50'ye eşit ya da daha az bir uzunlukta olabilir. Aralıklar, 17 ila 25, 19 ila 23 ve 19 ila 21 nükleotid uzunluğundadır. Burada kullanıldığı şekliyle, "antisens sarmalı" terimi, örneğin bir hedef RNA gibi bir hedef molekülüne yeterli bir şekilde tamamlayıcı olan bir siRNA bileşiğinin sarmalı anlamına gelmektedir.

Çift sarmallı siRNA bileşiğinin sens sarmalı, uzunlukça en az 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40, ya da 60 nükleotittir ya da bunlara eşit olabilir. Belki de, 200, 100, ya da 50'ye eşit ya da daha az bir uzunlukta olabilir. Aralıklar, 17 ila 25, 19 ila 23 ve 19 ila 21 nükleotid uzunluğundadır.

Çift sarmallı siRNA bileşiğinin çift sarmallı kısmı, uzunlukça en az 14, 15, 16 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40, ya da 60 nükleotit kadar olabilir ya da bunlara eşit olabilir. Belki de, 200, 100, ya da 50'ye eşit ya da daha az bir uzunlukta olabilir. Aralıklar, 15- 30, 17 ila 23, 19 ila 23 ve 19 ila 21 nükleotid çifti uzunluğundadır.

Birçok düzenlemede, siRNA bileşiği örneğin siRNA ajanları gibi, daha küçük siRNA bileşiklerini üretmek için bir endojen molekül ile, örneğin Dicer ile, bölünebilmek için yeteri kadar büyüktür.

Sens ve antisens sarmalları, çift- sarmallı siRNA bileşiği, molekülün bir ya da her iki ucunda çiftlenmemiş bölgeyi ya da bir tek sarmalı içerecek bir şekilde seçilebilmektedir. Böylece, bir çift- sarmallı siRNA bileşiği, örneğin, 1- 3 nükleotidin bir ya da iki 5' ya da 3' çıktısını ya da bir 3' çıktısı gibi bir çıktısını içermek üzere çiftlenen sens ve antisens sarmalları içerebilir. Çıktılar, bir sarmalın diğerinden daha uzun olmasının bir sonucu olabilir, ya da aynı uzunluktaki iki sarmalların katlanmasının sonucu olabilir. Bazı düzenlemeler en az bir 3' çıktısına sahiptir. Bir düzenlemede, bir siRNA molekülünün her iki ucu, bir 3' çıktısına sahip olacaktır. Bazı düzenlemelerde, çıktı 2 nükleotittir.

Bazı düzenlemelerde, dubleks bölge için uzunluk, örneğin yukarıda tartışılan ssiRNA bileşiği aralığında, uzunlukça 15 ve 30 arasında, ya da 18, 19, 20, 21, 22, ve 23 nükleotittir. ssiRNA bileşikleri, uzun dsiRNA'lardan doğal Dicer'le işlenmiş ürün uzunluklarına ve yapısına benzeyebilir. ssiRNA bileşiğinin iki sarmalının bağlı olduğu, örneğin kovalent bağlı olduğu düzenlemeler de dahil edilmiştir. Saç tokası yapısı, ya da gereken çift sarmallı bölgeyi temin eden diğer tek sarmallı yapılar ve bir 3' çıkıntısı da aynı zamanda buluşa dahildir.

Çift sarmallı siRNA bileşikleri ve tek- sarmallı siRNA bileşikleri de dahil olmak üzere burada tarif edilen siRNA bileşikleri, örneğin bir proteini kodlayan bir genin transkripti olan örneğin, mRNA gibi bir hedef RNA'nın susturulmasına aracılık edebilir. Uygunluk açısından, bu tür mRNA burada, susturulacak mRNA olarak da adlandırılmaktadır. Bu tür bir gen de aynı zamanda bir hedef gen olarak adlandırılır. Genelde, susturulacak olan RNA, endojen bir gen ya da patojen bir genidir. Buna ilaveten, mRNA dışındaki RNA'lar, örneğin tRNA'lar ve viral RNA'lar da hedeflenebilir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "RNAi'ye aracılık etme" ifadesi, bir sekansa spesifik bir şekilde bir hedef RNA'yı susturma yeteneğini ifade eder. Teoriye bağlı kalmak

istenmemekle birlikte, susturmanın RNAi makinesi ya da prosesini ve bir kılavuz RNA'yı, 21 ila 23 nükleotidli bir ssiRNA bileşiğini kullandığına inanılmaktadır.

Bir düzenlemede, bir siRNA bileşiği, örneğin, bir hedef mRNA gibi hedef bir RNA'ya "yeterince tamamlayıcı" olup, öyle ki siRNA bileşiği, hedef mRNA tarafından kodlanan proteinin üretimini susturur. Bir başka düzenlemede, siRNA bileşiği, örneğin hedef RNA gibi bir hedef RNA'ya "tam olarak tamamlayıcıdır" ve siRNA bileşiği, örneğin tamamen tamamlayıcılık bölgesinde sadece Watson- Crick baz çiftlerinden yapılmış bir melez oluşturmak üzere tavlanmaktadır. "Yeterince tamamlayıcı" bir hedef RNA, bir hedef RNA'ya tam olarak tamamlayıcı olan bir iç bölgeyi (örneğin, en az 10 nukleotid) içerebilir. Bundan başka, bazı düzenlemede, siRNA bileşiği özellikle bir tek- nükleotid farkını ayırt eder. Bu durumda, siRNA bileşiği, tam tamamlayıcılık, tek nukleotid farkı bölgesinde bulunduğunda (örneğin 7 nükleotidler içerisinde) sadece RNAi aracılık eder.

Hedef polinükleotitlerin ifadesini spesifik olarak inhibe etmek için RNA müdahalesi (RNAi) kullanılabilir. Genin ve nükleik asidin ifadesinin çift sarmallı RNA aracılı baskılanması, hücrelere veya organizmalara dsRNA, siRNA veya shRNA'nın sokulmasıyla gerçekleştirilebilir. siRNA çift sarmallı RNA veya hem RNA hem de DNA, örneğin bir RNA sarmalı ve bir DNA sarmalı içeren bir hibrit molekül olabilir. siRNA'ların bir hücreye doğrudan sokulmasının memeli hücrelerinde RNAi'yi tetikleyebildiği gösterilmiştir (Elshabir, S.M. vd., Nature 411: 494- 498 (2001)). Ayrıca memeli hücrelerinde baskılama RNA seviyesinde ortaya çıkmıştır ve RNA ve protein baskılaması arasında güçlü bir korelasyonla birlikte hedeflenen genler için spesifiktir (Caplen, N. Vd., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9746- 9747 (2001)). Ek olarak HeLa S3, COS7, 293, NIH / 3T3, A549, HT- 29, CHO- KI ve MCF- 7 hücreleri de dahil olmak üzere geniş bir çeşitlilikteki hücre hatlarının bir dereceye kadar siRNA susturmasına duyarlı olduğu gösterilmiştir (Brown, D. Vd., TechNotes 9(1): 1- 7, www.dot.ambion.dot.com / techlib / tn / 912.html (9 / 1 / 02) websitesinde bulunabilir).

Spesifik polinükleotitleri hedefleyen RNAi molekülleri teknikte bilinen prosedürlere göre kolayca hazırlanabilir. Etkili siRNA moleküllerinin yapısal karakteristikleri tanımlanmıştır. Elshabir, S. M. vd., (2001) Nature 411: 491- 498 ve Elshabir, S. M. Vd., (2001), EMBO 20: 6877- 6888. Buna göre teknikte uzman kimse spesifik bir geni veya transkripti hedeflemek için geniş bir çeşitlilikte farklı siRNA moleküllerinin kullanılabileceğini anlayacaktır. Belirli bazı düzenlemelerde buluşa göre siRNA

molekülleri çift sarmallıdır ve aradaki her bir tamsayıyı içerecek şekilde 16- 30 veya 18- 25 nükleotit uzunluğundadır. Bir düzenlemede bir siRNA 21 nükleotit uzunluğundadır. Belirli bazı düzenlemelerde siRNA'lar 0- 7 nükleotitlik 3' çıkıntılarına veya 0- 4 nükleotitlik 5' çıkıntılarına sahiptir. Bir düzenlemede bir siRNA molekülü bir iki nükleotitlik 3' çıkıntısına sahiptir. Bir düzenlemede bir siRNA iki nükleotitlik 3' çıkıntısı ile birlikte 21 nükleotit uzunluğuna sahiptir (yani sens ve antisens sarmalları arasına bir 19 nükleotitlik tamamlayıcı bölge içerir). Belirli bazı düzenlemelerde, çıkıntılar UU veya dTdT 3' çıkıntılarıdır.

Genel olarak siRNA molekülleri bir hedef DNA molekülünün bir sarmalı için tamamen tamamlayıcıdır çünkü tek bir baz çifti uyuşmazlığının bile susturmayı azalttığı gösterilmiştir. Diğer düzenlemelerde siRNA'lar, örneğin 2'- deoksi- veya 2'- O- metil modifikasyonları gibi modifiye bir iskelete sahip olabilir. Bununla birlikte tercih edilen düzenlemelerde siRNA sarmalının tamamı 2'- deoksi veya 2'- O- modifiye bazlardan yapılmaz.

Diğer bir düzenlemede burada açıklanan, bir hücredeki bir genin ifadesini inhibe etmek için bir vektör içeren bir hücredir. Vektör, burada açıklanan dsRNA'lardan birinin en az bir sarmalını kodlayan bir nükleotit dizisine işlevsel olarak bağlanan bir düzenleyici sekansı içerir.

Bir düzenlemede siRNA hedef bölgeleri, hedef mRNA transkript sekansının AA dinükleotit sekanslarının bulunuşu için taranması ile seçilir. 3' bitişik yaklaşık 19 nükleotit ile kombinasyon halindeki her bir AA dinükleotit sekansı potansiyel siRNA hedef bölgeleridir. Bir düzenlemede siRNA hedef bölgeleri tercih edilen şekliyle 5' ve 3' translate edilmemiş bölgeler arasında (UTR'ler) başlangıç kodonu (yaklaşık 75 baz içinde) yakınındaki bölgelerde konumlanmamıştır çünkü düzenleyici bölgelere bağlanan proteinler siRNP endonükleaz kompleksinin bağlanmasına müdahale edebilir (Elshabir, S. M. vd., (2001) Nature 411: 491- 498; Elshabir, S. M. Vd., (2001), EMBO 20: 6877- 6888). Ek olarak potansiyel hedef bölgeleri, BLASTN 2.0.5, www.ncbi.nlm'de NCBI sunucusu üzerinde bulunur, gibi uygun bir genom veritabanı ile karşılaştırılabilir ve diğer kodlama sekanslarına önemli derecede homolog olan potansiyel hedef sekansları elimine edilebilir.

Belirli bazı düzenlemelerde kısa saç tokası RNA'lar burada açıklanan nükleik asit- lipit parçacıklarının nükleik asit bileşenini yapılandırabilir. Kısa saç tokası RNA (shRNA),

sekansa spesifik olarak bir hedef genin ifadesini azaltma yeteneğine sahip bir saç tokası RNA formudur. Kısa saç tokası RNA'lar, hücresel ortamda genel olarak daha kararlı oldukları için ve bozunmaya karşı daha az duyarlı oldukları için gen ifadesini bastırmada siRNA'lara kıyasla bir avantaj sunabilirler. Bu tür kısa saç tokası RNA aracılı gen susturmanın, çeşitli normal ve kanser hücre hatlarında ve fare ve insan hücreleri de dahil olmak üzere memeli hücrelerinde çalıştığı gösterilmiştir. Paddison, P. Vd., Genes Dev. 16(8): 948- 58 (2002). Ayrıca tasarlanan shRNA'ları kodlayan kromozal genleri taşıyan transgenik hücre hatları üretilmiştir. Bu hücreler yapısal olarak shRNA'ları sentezleme kabiliyetine sahiptirler, dolayısıyla döl hücrelerine geçebilen uzun süreli veya yapısal gen susturmayı kolaylaştırırlar. Paddison, P. vd., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(3): 1443- 1448 (2002).

shRNA'lar bir kök ilmek yapısını içerirler. Belirli bazı düzenlemelerde çeşitli kök uzunluklarına, tipik olarak 19 ila 29 nükleotit uzunluğuna veya bunların arasındaki herhangi bir sayıdaki uzunluğa sahip olabilirler. Belirli bazı düzenlemelerde saç tokası 19 ila 21 nükleotit köküne sahip olabilirken, diğer düzenlemelerde saç tokaları 27 ila 29 nükleotit köklerine sahip olabilir. Belirli bazı düzenlemelerde ilmek boyutu 4 ila 23 nükleotit uzunluğundadır, ancak ilmek boyutu susturma aktivitesini önemli derecede etkilemeden 23 nükleotitten büyük olabilir. shRNA molekülleri, örneğin tesiri azaltmadan shRNA'nın iki sarmalı arasındaki G- U uyuşmazlığı gibi uyuşmazlıkları içerebilirler. Aslında belirli bazı düzenlemelerde shRNA'lar, örneğin bakterilerin çoğalması sırasında saç tokalarını stabilize etmek için saç tokası kökünde bir veya birkaç G- U çiftlenmesi içermek üzere tasarlanmışlardır. Bununla birlikte hedef mRNA'ya (antisens sarmalı) bağlanan kök kısmı ve mRNA arasında tamamlayıcılık tipik olarak gereklidir ve bu bölgede tek bir baz çifti uyuşmazlığı bile susturmayı ortadan kaldırabilir. 5' ve 3' çıkıntıları gerekli değildir çünkü mevcut olabilmelerine rağmen shRNA fonksiyonu için kritik olmadıkları görülür (Paddison vd., (2002) Genes & Dev. 16(8): 948- 58).

MikroRNA'lar

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), bitki ve hayvanların genomlarında DNA'dan kopyalanan, ancak proteine dönüştürülmeyen, oldukça yüksek bir şekilde korunmuş küçük RNA moleküllerin bir sınıfıdır. İşlenmiş miRNA'lar, tek sarmallı ~17- 25 nükleotid (nt) RNA molekülleri olup, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) içerisine dahil edilirler ve gelişim, hücre proliferasyonu, apoptoz ve farklılaşmanın anahtar düzenleyicileri olarak

tanımlanmışlardır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde, 3'- çevrilmemiş spesifik mRNA bölgesine bağlanarak bir rol oynadıklarına inanılmaktadır. RISC, gen ekspresyonunun translasyon inhibisyonu, transkript bölünmesi, ya da her ikisi doğrultusunda aşağı regülasyonuna aracılık eder. RISC, aynı zamanda geniş bir ökaryot aralığındaki nükleus içindeki transkripsiyonel susturmada da rol oynar.

Bugüne kadar tanımlanmış miRNA sekanslarının sayısı, büyüktür ve gelişmeye devam etmektedir, bunun açıklayıcı örnekleri, örneğin: "miRBase: mikroRNA dizileri, hedefler ve gen nomenklatürleri" Griffiths- Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140- D144; "The mikroRNA Registry" Griffiths- Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109- D111 sayılı belgelerde; ve aynı zamanda

http: / / mikroma.sanqer.ac.uk / sequences /_adresinden bulunabilir.

Antisens Oligonükleotitleri

Bir düzenlemede, bir nükleik asit, bir hedef polinükleotide yönelik bir antisens oligonükleotididir. "Antisens oligonükleotid" terimi, ya da basitçe "antisens" teriminin, hedeflenmiş bir polinükleotid sekansına tamamlayıcı olan oligonükleotidleri içerdiği anlamına gelir. Antisens oligonükleotidleri, seçilen bir sekansa tamamlayıcı olan DNA ya da RNA'nın tek sarmallarıdır. Örneğin, bir hedef gen mRNA'sıdır. Antisens oligonükleotidlerinin tamamlayıcı bir mRNA'ya bağlanarak gen ifadesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Hedef mRNA'ya bağlanma, gen ifadesinin inhibisyonuna, ya tamamlayıcı mRNA sarmallarının ona bağlanarak translasyonunu önleyerek ya da hedef mRNA'nın bozunmasına yol açarak gen ifadesinin inhibisyonuna yol açabilir. Antisens DNA, spesifik, tamamlayıcı (kodlayan ya da kodlamayan) RNA'yı hedeflemek için kullanılabilir. Bağlanma gerçekleşirse, bu DNA / RNA hibrid enzim RNaz H tarafından bozunabilir. Bazı uygulamada, antisens oligonükleotidleri yaklaşık 10 ila yaklaşık 50 arasında nükleotidleri, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 15 ila yaklaşık 30 arasında nükleotidleri içerir. Terim aynı zamanda istenen hedef gene tam olarak tamamlayıcı olamayan antisens oligonükleotidleri de kapsar. Bu nedenle, tarifname, hedef olmayan spesifik aktivitelerin, antisens ile bulunduğu durumlarda kullanılabilir, ya da, hedef sekansının belirli bir kullanım için en çok tercih edildiği durum ile bir ya da daha fazla uyumsuzluk içeren bir antisens sekansının bulunduğu durumlarda kullanılabilir.

Antisens oligonükleotidlerinin, protein sentezinin etkili ve hedeflenmiş inhibitörleri olduğu gösterilmiştir ve sonuç olarak, hedeflenen bir gen tarafından protein sentezini spesifik olarak inhibe etmek için kullanılabilir. Protein sentezini inhibe etmek için antisens oligonükleotidlerin etkinliği iyi oluşturulmuştur. Örneğin, poligalaktauronaz ve muskarin tip 2 asetilkolin reseptörünün sentezi, ilgili mRNA sekanslarına yönlendirilen antisens oligonükleotidler tarafından inhibe edilir (U. S. Patent 5,739,119 ve U. S. Patent 5,759,829 sayılı belgeler). Ayrıca, antisens inhibisyonu örnekleri, nükleer protein siklin, çoklu ilaç dirençli gen (MDG1), ICAM- 1, E- selektin, STK- 1, striatal $GABA_A$ reseptörü ve insan EGF'si ile gösterilmiştir (Jaskulski ve diğ., Science. 1988 Jun 10; 240(4858): 1544- 6; Vasanthakumar ve Ahmed, Cancer Commun. 1989; 1 (4): 225- 32; Peris ve diğ., Brain Res Mol Brain Res. 1998 Jun 15; 57(2): 310- 20; U. S. Patent 5,801,154; U.S. Patent 5,789,573; U. S. Patent 5,718,709 ve U.S. Patent 5,610,288 sayılı belgeler). Ayrıca, antisens yapıları da aynı zamanda çeşitli anormal hücresel proliferasyonları, örneğin kanseri, önlemek ve tedavi etmek için kullanılabildiği açıklanmıştır (U. S. Patent 5,747,470; U. S. Patent 5,591,317 ve U. S. Patent 5,783,683 sayılı belgeler).

Antisens oligonükleotidleri üretme yöntemleri teknikte bilinmektedir ve herhangi bir polinükleotid sekansını hedefleyen bir antisens oligonükleotidinin üretilmesi için kolaylıkla uyarlanabilir. Belirli bir hedef sekans için spesifik antisens oligonükleotid sekanslarının seçimi, seçilen hedef sekansın analizine ve ikincil yapı, T_m, bağlanma enerjisi ve nispi stabilitenin belirlenmesine dayanır. Antisens oligonükleotidleri, bir konakçı hücrede hedef mRNA'ya spesifik bağlanmayı azaltabilmesi ya da engellenmesi üzere dimerleri, saç tokaları yapıları ya da diğer sekonder yapıları oluşturmak için göreceli yetersizliklerine bağlı olarak seçilebilir. mRNA'nın oldukça fazla tercih edilen hedef bölgeleri, AUG translasyon başlatma kodonunun yakınında bulunan ya da bu kodonda bulunan bu bölgeleri ve mRNA'nın 5' bölgelerine tamamlayıcı olan bu sekansları içerir. Bu sekonder yapı analizleri ve hedef alan seçimi varsayımları, v.4 OLIGO primer analizi yazılımı (Molecular Biology Insights) ve / veya BLASTN 2.0.5 algoritma yazılımı (Altschul ve diğ. Nucleic Acids Res. 1997, 25(17): 3389- 402) kullanılarak oluşturulabilir.

Antagomirler

Antagomirler, RNAz koruması ve artmış doku ve hücresel alım gibi farmakolojik özellikler için çeşitli modifikasyonları barındıran RNA benzeri oligonükleotidlerdir.

Bunlar, normal RNA'dan, örneğin, şeker, fosforotioat omurgası ve örneğin, 3'- ucunda kolesterol- kısmının tam 2'- O- metilasyonu ile ayrılırlar. Antagomirler, antagomir ve endojen miRNA'ları içeren dubleksler oluşturarak etkili bir şekilde susturma endojen miRNA'ları için kullanılabilir, böylece miRNA ile kaynaklanan gen susturulmasını önler. Antagomir aracılı miRNA susturmaya ait bir örnek, Krutzfeldt ve diğ., Nature, 2005, 438: 685- 689 sayılı belgede tarif edilen miR- 122'nin susturulmasıdır. Antagomir RNA'ları standart katı faz oligonükleotid sentezi protokolleri kullanılarak sentezlenebilir. Bakınız U.S. Patent Application Ser. Nos. 11 / 502,158 ve 11 / 657,341 sayılı belge.

Bir antagomir, oligonükleotid sentezi için ligand- konjuge monomer alt- birimleri ve monomerleri içerebilir. Örnek teşkil eden monomerler, 10 Ağustos 2004'te dosyalanan U.S. Başvuru No. 10 / 916,185 sayılı belgede tarif edilmiştir. Bir antagomir, 8 Mart 2004 tarihinde dosyalanan PCT Başvurusu No. PCT / US2004 / 07070 sayılı belgede açıklandığı gibi bir ZXY yapısına sahip olabilir. Bir antagomir, bir amfipatik kısım ile kompleks hale getirilebilir. Oligonükleotid ajanlar ile kullanım için örnek teşkil eden amfipatik kısımlar, 8 Mart 2004 tarihinde dosyalanmış PCT Başvurusu No. PCT / US2004 / 07070 sayılı tarif edilmiştir.

Aptamerler

Aptamerler, yüksek afinite ve özgüllüğe sahip belirli bir ilgi molekülüne bağlanan nükleik asit ya da peptid molekülleridir (Tuerk ve Gold, Science 249: 505 (1990); Ellington ve Szostak, Nature 346: 818 (1990) sayılı belge). Büyük proteinlerden küçük organik moleküllere kadar birçok farklı varlıkları bağlayan DNA ya da RNA aptamerleri başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bakınız Eaton, Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 10- 16 (1997), Famulok, Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 324- 9(1999), ve Hermann ve Patel, Science 287: 820- 5 (2000). Aptamerler RNA ya da DNA bazlı olabilir, ve bir ribosiviç içerebilir. Bir ribosiviç, bir mRNA molekülünün, küçük bir hedef moleküle direkt olarak bağlanabilen ve hedefin bağlanmasının genin aktivitesini etkilediği bir parçasıdır. Böylece, bir ribosiviç içeren bir mRNA, kendi hedef molekülünün mevcudiyetine ya da yokluğuna bağlı olarak, kendi aktivitesini düzenlemede doğrudan rol oynar. Genel olarak, aptamerler, örneğin küçük moleküller, proteinler, nükleik asitler ve hatta hücre, dokular ve organizmalar gibi çeşitli moleküler hedeflere bağlanmaları için in vitro seçimin ya da eşit bir şekilde tekrarlanan kontrolü, SELEX (üslü zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi) yoluyla tasarlanmıştır. Aptamer, sentetik, rekombinant ve saflaştırma

metotları da dahil olmak üzere bilinen herhangi bir metot ile hazırlanabilir ve tek başına ya da aynı hedef için spesifik diğer aptamerler ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Ayrıca, burada daha ayrıntılı olarak tarif edildiği gibi "aptamer" terimi, özellikle verilen bir hedefe iki ya da daha fazla bilinen aptameri karşılaştırmaktan türetilen bir konsensüs sekansını içeren "sekonder aptamerler" terimini içerir.

Ribozimler

Bunun içinde tarif edilen başka bir uygulamaya göre, nükleik asit- lipit partikülleri ribozimler ile ilişkilidir. Ribozimler, endonükleaz aktivitesine sahip olan spesifik katalitik alanlara sahip RNA molekül kompleksleridir (Kim ve Cech, Proc Natl Acad Sci USA. 1987 Dec; 84(24): 8788- 92; Forster ve Symons, Celi. 1987 Apr 24; 49(2): 211- 20 sayılı belgeler). Örneğin, çok sayıda ribozim, bir oligonükleotid substratta sıklıkla birkaç fosfoesterden sadece birini bölerek yüksek derecede spesifite ile fosfoester transfer reaksiyonlarını hızlandırır (Cech ve diğ., Celi. 1981 Dec; 27(3 Pt 2): 487- 96; Michel ve Westhof, J Mol Biol. 1990 Dec 5; 216(3): 585- 610; Reinhold- Hurek ve Shub, Nature. 1992 May 14; 357(6374): 173- 6 sayılı belgeler). Bu özgünlük, substratın kimyasal reaksiyondan önce ribozimin dahili kılavuz sekansına ("IGS") spesifik baz eşleştirme etkileşimleri vasıtasıyla bağlanması gereksinimine bağlanmıştır.

Doğal olarak oluşan enzimatik RNA'ların en az altı temel çeşidi günümüzde bilinmektedir. Her biri, trans halindeki RNA fosfodiester bağlarının hidrolizini fizyolojik koşullar altında (ve böylece diğer RNA moleküllerini bölebilir) katalize edebilir. Genelde, enzimatik nükleik asitler, bir hedef RNA'ya ilk bağlanarak hareket eder. Bu tür bağlanma, hedef RNA'nın bölünmesi için etki eden molekülün bir enzimatik kısmına çok yakın bir yerde tutulan bir enzimatik nükleik asitin hedef bağlama kısmı yoluyla oluşur. Böylece, enzimatik nükleik asit ilk önce tanımlanır ve daha sonra tamamlayıcı baz eşleştirmesi ile bir hedef RNA'yı bağlar ve bir kez doğru yere bağlanır, hedef RNA'yı kesmek için enzimatik olarak hareket eder. Bu tür bir hedef RNA'nın stratejik bölünmesi, kodlanmış bir proteinin sentezini doğrudan değiştirme yeteneğini ortadan kaldıracaktır. Bir enzimatik nükleik asidin bağlanması ve kendi RNA hedefini bölmesinden sonra, başka bir hedef aramak için bu RNA'dan salınır ve tekrar tekrar yeni hedeflere bağlanabilir.

Enzimatik nükleik asit molekülü, bir çekiç başı, saç tokası, bir hepatit δ virüs, grup I intron ya da RNazP RNA'sında (bir RNA kılavuz sekansı ile bağlantılı olarak) ya da

Neurospora VS RNA motif, örneğin oluşturulabilir. Çekiç başı motiflerinin spesifik örnekleri, Rossi ve diğ. Nükleik Acids Res. 1992 Sep 11; 20(17): 4559- 65 sayılı belge ile tarif edilmiştir. Saç tokası motiflere ait örnekler, Hampel ve diğ. (Eur. Pat. Appl. Publ. No. EP 0360257), Hampel ve Tritz, Biochemistry 1989 Haziran 13; 28(12): 4929- 33; Hampel ve diğ., Nucleic Acids Res. 1990 Ocak 25; 18(2): 299- 304 ve U. S. Patent 5,631,359 sayılı belgeler tarafından tarif edilmektedir. Hepatit δ virüs motifine ait bir örnek, Perrotta ve Been, Biyokimya. 1992 1 Aralık; 31 (47): 11843- 52 sayılı belgede tarif edilmiştir; RNAzP'ye ait bir örnek, Guerrier- Takada ve diğ., Celi. 1983 Aralık 35(3 Pt 2): 849- 57 sayılı belgede tarif edilmiştir; Neurospora VS RNA ribozim motifi Collins (Saville ve Collins, Celi. 1990 Mayıs 18; 61(4): 685- 96; Saville ve Collins, Proc Natl Acad Sci USA. 1991 Ekim 1; 88(19): 8826- 30; Collins ve Olive, Biochemistry. 1993 25 Mar 23; 32(11): 2795- 9 sayılı belgeler) tarafından tarif edilmiştir; ve Grup I introna ait bir örnek, U. S. Patent 4,987,071 sayılı belgede tarif edilmiştir. Buluşa göre kullanılan enzimatik nükleik asit moleküllerinin önemli karakteristikleri, hedef gen DNA ya da RNA bölgelerinin bir ya da daha fazlasına tamamlayıcısı olan spesifik bir substrat bağlanma alanına sahip olmaları ve moleküle bir RNA bölünme aktivitesi veren substrat bağlanma bölgesi içerisinde ya da çevreleyen nükleotid sekanslarına sahip olmalarıdır. Böylece ribozim yapılarının, burada belirtilen spesifik motiflerle sınırlı olması gerekmez.

Herhangi bir polinükleotid sekansına hedeflenen bir ribozim üretme metotları, teknikte bilinmektedir. Ribozimler, Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 93 / 23569 ve Int. Pat. Appl. Publ. No. WO 94 / 02595 sayılı belgede tarif edildiği gibi tasarlanabilir ve burada tarif edildiği gibi, in vivo ve in vivo olarak test edilecek şekilde sentezlenir.

Ribozim aktivitesi, ribozim bağlama kollarının uzunluğunu değiştirerek ya da ribozomları kimyasal ribozimler ile değiştirerek, serum ribonükleazları tarafından bozunmasını önleyen modifikasyonlarla (bakınız, örneğin, Uluslararası Patent Başvurusu Yayın No. WO 92 / 07065; Uluslararası Patent Başvurusu Yayın No. WO 93 / 15187; Uluslararası Patent Başvurusu Yayın No. WO 91 / 03162; Avrupa Patent Başvurusu Yayın No. 92110298.4; U.S. Patent 5,334,711; ve Uluslararası Patent Başvurusu Yayın No. WO 94 / 13688, enzimatik RNA moleküllerinin şeker kısımlarına yapılabilecek çeşitli kimyasal modifikasyonları tanımlar), burada RNA sentez sürelerini kısaltmak ve kimyasal gereksinimleri azaltmak için hücre II'de etkinliğini artıran ve kök II bazlarının uzaklaştırılmasını sağlayan modifikasyonlarla optimize edilebilir.

Burada tarif edilen kompozisyonlarda ve metotlarda kullanılması için uygun oligonükleotidlerin (ODN'ler) ilave spesifik nükleik asit sekansları, US Patent Başvurusu No. 60 / 379,343'te, US patent başvurusu Seri No. 09 / 649,527'e, Uluslar arası Yayın WO 02 / 069369, Uluslar arası Yayın No WO01 / 15726, US Patent No. 6,406,705 ve Raney ve diğ., Journal of Pharmacology ve Experimental Therapeutics, 298: 1185- 1192 (2001) sayılı belgede tarif edilmiştir. Bazı düzenlemelerde, burada tarif edilen kompozisyonlarda ve metotlarda kullanılan ODN'ler, bir fosfodiester ("PO") omurgaya ya da bir fosforotioat ("PS") omurgaya ve / veya bir CpG motif içinde en az bir metillenmiş sitosin kalıntısına sahiptir.

Nükleik Asit Modifikasyonları

1990'larda DNA tabanlı antisens oligodeoksinükleotitler (ODN) ve ribozimler (RNA), ilaç tasarımı için yeni, heyecan verici bir paradigma ve gelişim gösterdi, ancak bunların in vivo uygulamaları endo- ve egzo- nükleaz aktivitesi ve bunun yanı sıra başarılı hücre içi dağıtımın eksikliğinden dolayı engellendi. Bozunma konusu, oligonükleotit (oligo) ilaçların nükleaz enzimleri tarafından tanınmasını önleyen ancak bunların etki mekanizmalarını engelleyemeyen kimyasal modifikasyonlar üzerinde yapılan takip eden kapsamlı araştırma ile etkin bir şekilde aşıldı. Bu araştırma, günümüzde gelişmekte olan antisens ODN ilaçların, değiştirilmemiş moleküller için dakikalar ile karşılaştırıldığında in vivo olarak günlerce bozunmadan kalması oldukça başarılıydı (Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem 270: 1628- 44). Bununla birlikte, hücre içi dağıtım ve etki mekanizma konuları bugüne kadar antisens ODN ve ribozimlerin klinik ürün haline gelmesini sınırlamıştır.

RNA dupleksleri doğal olarak tek sarmallı DNA veya RNA'ya göre nükleazlara daha stabildir ve antisens ODN'nin aksine, modifiye edilmemiş siRNA sitoplazmaya eriştiklerinde iyi aktivite gösterir.

Yine de ne kadar kimyasal modifikasyonunun tolere edilebileceğini ve farmakokinetik ve farmakodinamik aktivitenin artırılıp artırılamayacağını belirlemek için ODN ve ribozomlar aynı zamanda sistematik olarak siRNA'ya uygulanmıştır. siRNA dupleksler tarafından RNA müdahalesi bir antisens ve sens sarmalını gerektirir ki bu farklı fonksiyonlara sahiptir. Her ikisi de siRNA'nın RISC'e girmesini sağlamak için gereklidir, ancak bir kez yüklendiğinde iki sarmal ayrılır ve sens sarmalı bozunur oysaki antisens

sarmalı RISC'yi hedef mRNA'ya yönlendirmek için olduğu gibi kalır. RISC'e giriş, hedef mRNA'nın tanınması ve ayrılmasından yapısal olarak daha az zorlayıcıdır. Sonuç olarak sens sarmalının pek çok farklı kimyasal modifikasyonu mümkündür ancak yalnızca sınırlı değişimler antisens sarmalı tarafından tolere edilebilir (Zhang vd., 2006).

Teknikte bilindiği üzere bir nükleosit bir baz- şeker kombinasyonudur. Nükleotitler, ayrıca nükleositin şeker kısmına kovalent olarak bağlanan bir fosfat grubunu içeren nükleositlerdir. Bir pentofurasonil şekeri içeren nükleositler için fosfat grubu şekerin 2', 3' veya 5' hidroksil grubuna bağlanabilir. Oligonükleotitler oluşurken, fosfat grupları doğrusal bir polimerik bileşik oluşturmak üzere bitişik nükleositleri bir diğerine kovalent olarak bağlarlar. Dolayısıyla bu doğrusal polimerik yapının ilgili uçları ayrıca dairesel bir yapı oluşturmak üzere birleştirilebilir. Oligonükleotit yapısı içinde, fosfat grupları sıklıkla oligonükleotitlerin internükleosit iskeletini oluşturduğu şeklinde anılır. RNA ve DNA'nın normal bağı veya iskeleti bir 3' veya 5' fosfodiester bağıdır.

Bir lipit- nükleik asit parçacığında kullanılan, burada tarif edilen nükleik asit bilinen herhangi bir formdaki nükleik asidi içerir. Böylece nükleik asit, nükleaz direncini ve serum stabilitesini artırmak için daha önce kullanılan türde bir modifiye nükleik asit olabilir. Ancak, şaşırtıcı bir şekilde terapötik ürünler, doğal nükleik asit polimerlerinin fosfodiester bağında modifikasyona sahip olmayan nükleik asitlerden gelen lipit-nükleik asit parçacıklarını formüle etmek için burada tarif edilen yöntemin kullanılması ile de hazırlanabilirler ve modifiye edilmemiş fosfodiester nükleik asitlerin kullanımı (yani tüm bağların fosfodiester bağları olduğu nükleik asitler) tercih edilen bir düzenlemedir.

İskelet Modifikasyonları

Burada faydalı olan antisens, siRNA ve diğer oligonükleotitler, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte modifiye iskeletleri veya doğal olmayan internükleosit bağlarını içeren oligonükleotitleri içerir. Modifiye iskeletlere sahip oligonükleotitler iskelette bir fosfor atomunu bulunduran ve iskelette bir fosfor atomuna sahip olmayanları içerir. İnternükleosit iskeletlerinde bir fosfor atomuna sahip olmayan modifiye oligonüklotitler de aynı zamanda oligonükleositler olarak düşünülebilir. Modifiye oligonükleotit iskeletleri aynı zamanda, örneğin fosforotiyoatları, kiral fosforotiyoatları, fosforoditiyoatları, fosfortriesterleri, aminoalkilfosfotri- esterleri, 3'- alkilen fosfonatlar

ve kiral fosfonatlar da dahil olmak üzere diğer metil ve alkil fosfonatları, fosfinatları, 3'-amino fosforamidat ve aminoalkilfosforamidatlar da dahil olmak üzere fosforamidatları, tiyonofosforamidatları, tiyonoalkilfosfonatları, tiyonoalkilfosfotriesterleri, fosforoselenat, metilfosfonat veya O- alkil fosfotriester bağlarını ve normal 3'- 5' bağlarına sahip boranofosfatlar, bunların 2' – 5' bağlı analogları ve nükleosit birimlerinin bitişik çiftlerinin 3' – 5''den 5' – 3''e veya 2' – 5''den 5' – 2''ye bağlandığı durumda ters çevrilmiş polariteye sahip olanlarını içerir. Burada tarif edilen bir nükleik asit içinde bulunabilecek belirli modifikasyonların belirli, sınırlayıcı olmayan örnekleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

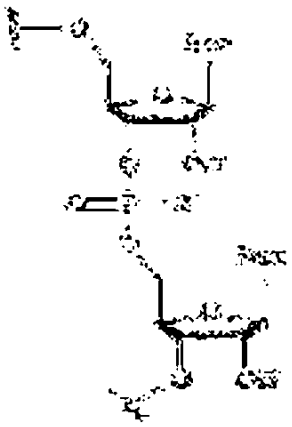
Çeşitli tuzlar, tuz karışımları ve serbest asit formları da dahildir. Yukarıdaki bağların hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte US Patent No. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361 ve 5,625,050'yi içerir.

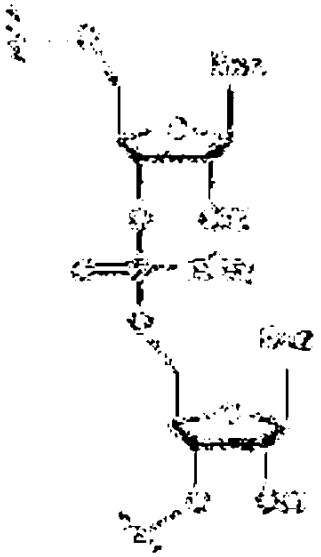
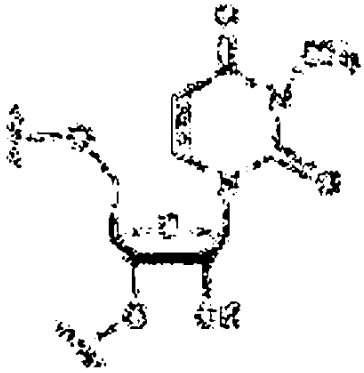
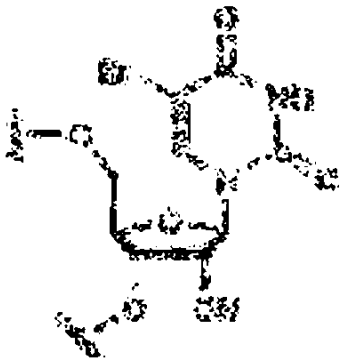
Belirli bazı düzenlemelerde bir fosfor atomu içermeyen modifiye oligonükleotit iskeletler kısa zincirli alkil veya sikloalkil internükleosit bağlar, karışık heteroatom ve alkil veya sikloalkil internükleosit bağlar veya bir veya daha fazla kısa zincir heteroatomik veya heterosiklik internükleosit bağlar tarafından oluşturulan iskeletlere sahiptirler. Bunlar, örneğin morfolin bağları (kısmen bir nükleositin şeker kısmından oluşan); siloksan iskeletler; sülfür, sülfoksit ve sülfon iskeletleri; formasetil ve tiyoformasetil iskeletleri, metilen formasetil ve tiyoformasetil iskeletleri; alken içeren iskeletler; sülfamat iskeletleri; metilenimino ve metilenhidrazino iskeletleri; sülfonat ve sülfonamid iskeletleri ve karışık N, O, S ve CH_2 bileşen parçalarına sahip diğerlerini içerir. Yukarıdaki oligonükleositleri tarif eden temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte US Patent No. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437 ve 5,677,439'u içerir.

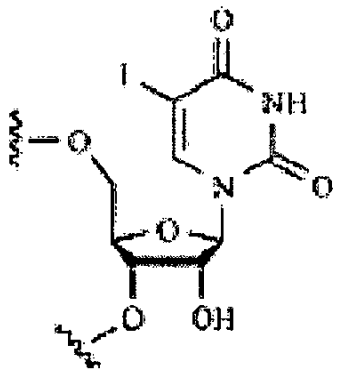
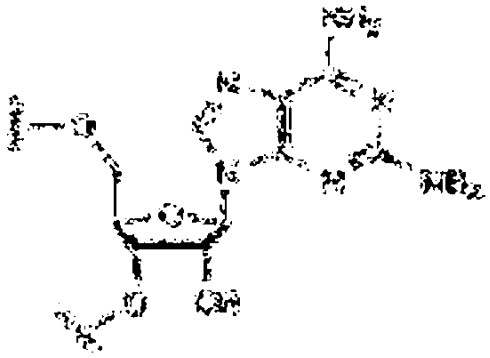
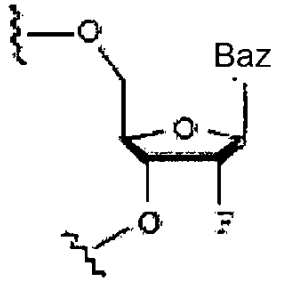
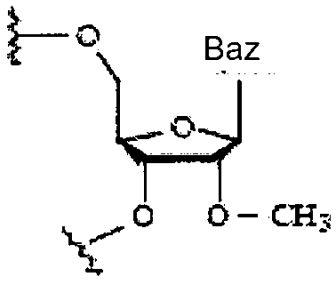
Fosfodiester bağında köprü oluşturmayan bir oksijenin kükürt ile yer değiştirdiği fosforotiyoat iskeleti modifikasyonu (Tablo 3, #1), nükleik asit ilaçlarını nükleaz

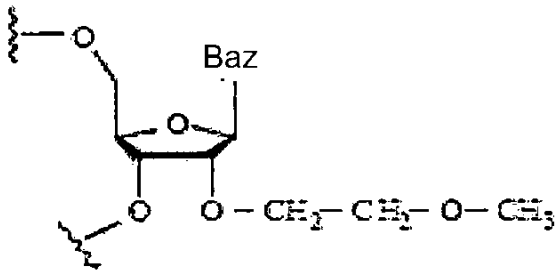
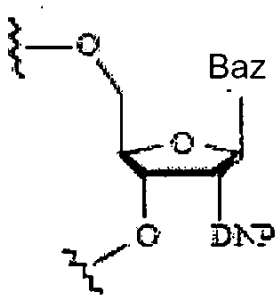
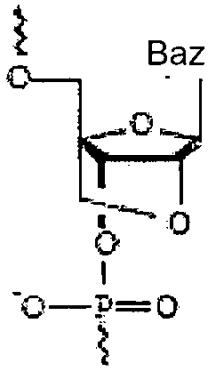
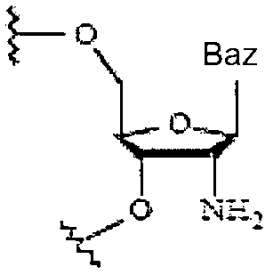
bozunmasına karşı stabilize etmek için uygulanan en eski ve en yaygın araçlardan biridir. Genel olarak aktivite üzerinde pek fazla etki yaratmadan her iki siRNA sarmalında yoğun bir şekilde PS modifikasyonları yapılabileceği görülmektedir (Kurreck, J., Eur. J. Biochem. 270: 1628- 44, 2003). Ancak PS oligoların toksisiteyle sonuçlanacak şekilde, özellikle intravenöz uygulama üzerine spesifik olmayan bir biçimde istekli olarak proteinlerle birleştiği bilinmektedir. Bu nedenle PS modifikasyonu genellikle 3' ve 5' uçlarında bir veya iki baz ile sınırlandırılır. Boranofosfat bağlayıcı (Tablo 3, #2), açık bir şekilde PS'den daha stabil bir yakın zamanlı modifikasyondur, siRNA aktivitesini artırır ve düşük bir toksisiteye sahiptir (Hall vd., Nucleic Acids Res. 32: 5991- 6000, 2004).

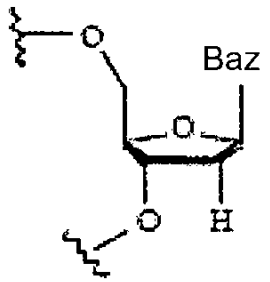
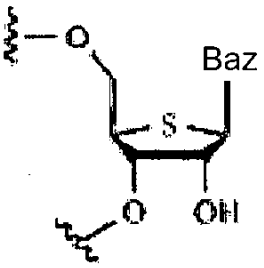
Tablo 3. siRNA ve Diğer Nükleik Asitlere Uygulanan Kimyasal Modifikasyonlar

#	Kısaltma	Ad	Modifikasyon Alanı	Yapı
1	PS	Fosforotionat	Omurga	

2	PB	Boranofosfat	Omurga	
3	N3- MU	N3- metil-üridin	Baz	
4	5'- BU	5'- brom-urasil	Baz	

5	5'- IU	5'- iyot-urasil	Baz	
6	2,6- DP	2,6-diaminopürin	Baz	
7	2'- F	2'- Flor	Şeker	
8	2'- OME	2''- O- metil	Şeker	

9	2'- O-MOE	2'- O- (2,4-metoksietil)	Şeker	
10	2'- DNP	2'- O- (2,4-dinitrofenil)	Şeker	
11	LNA	Kilitli Nükleik Asit (2'-oksijen ile riboz halkasının 4'-karbonunu metilen köprüsü bağlar)	Şeker	
12	2'-Amino	2'- Amino	Şeker	

13	2'-Deoksi	2'- Deoksi	Şeker	
14	4'- tio	4'- tio-ribonükleotit	Şeker	

Diğer faydalı nükleik asit türevleri, köprüleme oksijen atomlarının (fosfoester bağlarını oluşturanlar) –S- ,- NH- ,- CH2- ve benzerleri ile değiştirildiği nükleik asit moleküllerini içerir. Belirli düzenlemelerde, kullanılan antisens, siRNA ya da diğer nükleik asitlerdeki değişiklikler nükleik asitlerle ilişkili negatif yükleri tam olarak etkilemeyecektir. Bu yüzden, bağların bir kısmının örneğin bir nötr metil fosfonat ya da fosforamidat bağları ile değiştirilen antisens, siRNA ve diğer nükleik asitlerin kullanımı düşünülmektedir. Nötr bağlar kullanıldığında, belirli düzenlemede, nükleik asit bağlarının % 80'den daha azı bu şekilde ikame edilir ya da bağların % 50'sinden daha azı ikame edilir.

Baz Modifikasyonları

Baz modifikasyonları iskelet ve şeker modifikasyonlarından daha az yaygındır. 0,3 – 6'da gösterilen modifikasyonların tamamının nükleazlara karşı siRNA'yı stabilize ettiği ve aktivite üzerinde çok küçük bir etki yarattığı görülmektedir (Zhang, H. Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. Curr Top Med Chem 6: 893- 900).

Buna göre oligonükleotitler aynı zamanda nükleobazları (sıklıkla teknikte basitçe "baz" olarak belirtilir) modifikasyonları veya sübstitüsyonları da içerebilir. Burada kullanıldığı haliyle "modifiye edilmemiş" veya "doğal" nükleobazlar pürin bazları adenin (A) ve guanin (G) ve primidin bazları timin (T), sitosin (C) ve urasili (U) içerir. Modifiye nükleobazlar 5- metilsitosin (5- me- C veya m5c), 5- hidroksimetil sitosin, ksantin,

hipoksantin, 2- aminoadenin, adenin ve guaninin 6- metil ve diğer alkil türevleri, adenin ve guaninin 2- propil ve diğer alkil türevleri, 2- tiyourasil, 2- tiyotimin ve 2- tiyositosin, 5- halourasil ve sitosin, 5- propinil urasil ve sitosin, 6- azo urasil, sitosin ve timin, 5- urasil (psödourasil), 4- tiyourasil, 8- halo, 8- amino, 8- tiyol, 8- tiyoalkil, 8- hidroksil ve diğer 8- sübstitüe adeninler ve guaninler, 5- halo özellikle 5- bromo, 5- triflorometil ve diğer 5- sübstitüe urasiller ve sitosinler, 7- metilguanin ve 7- metiladenin, 8- azaguanin ve 8- azaedenin, 7- deazaguanin ve 7- deazaadenin ve 3- deazaguanin ve 3- deazaedenin gibi diğer sentetik ve doğal nükleobazları içerir.

Belirli bazı nükleobazlar burada tarif edilen, 2- aminopropiladenin, 5- propinilurasil ve 5- propinilsitosini içeren 5- sübstitüe primidinler, 6- azaprimidinler ve N- 2, N- 6 ve O- 6 sübstitüe pürinleri içeren oligomerik bileşiklerin bağlanma afinitesini artırmak için özellikle faydalıdırlar. 5- Metilsitosin sübstitüsyonlarının nükleik asit dupleks stabilitesini 0.6 – 1.2 ℃ arasında artırdı ğı gösterilmiştir (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. ve Lebleu, B., ed., Antisense Research and Applications 1993, CRC Press, Boca Raton, sayfa 276 – 278). Bunlar, özellikle düzenlemeler 2'- O- metoksietil şeker modifikasyonları ile kombine edilebilir. Bu modifiye nükleobazlardan belirli bir kısmının ve bunların yanı sıra diğer modifiye nükleobazların hazırlanmasını öğreten Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte yukarıda belirtilen US Patent No. 3,687,808'i ve bunun yanı sıra US Patent No. 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617 ve 5,681,941'i içerir.

Şeker Modifikasyonları

Şeker grubu üzerindeki tüm modifikasyonlar RNA şeker halkasının 2'- OH'ı üzerinde meydana gelir ki bu uygun bir kimyasal reaktif bölge sağlar (Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. Curr Opin Chem Biol 8: 570- 9; Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA interference with chemically modified siRNA. Curr Top Med Chem 6: 893- 900). 2'- F ve 2'- OME (0.7 ve 8) yaygındır ve her ikisi de stabiliteyi artırır, 2'- OME modifikasyonu sarmal başına 4 nükleotitten daha azı ile sınırlı olduğu sürece aktiviteyi azaltmaz (Holen, T.,

Amarzguioui, M., Babaie, E., Prydz, H. 2003. Similar behaviour of single strand and double- strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. Nucleic Acids Res 31: 2401- 7). 2'- O- MOE (0.9) en çok, modifiye bazlar molekülün orta bölgesi ile sınırlandığında siRNA içinde etkilidir (Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bhat, B. 2005. Positional effect on chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. J Med Chem 48: 4247- 53). Aktivite kaybı olmadan siRNA'yı stabilize ettiği bulunan diğer modifikasyonlar 0.10 – 14 arasında gösterilir.

Modifiye oligonükleotitler aynı zamanda bir veya daha fazla sübstitüe şeker grubu içerebilirler. Örneğin burada oligonükleotitler aşağıdakilerden birini 2' konumunda içerir: OH; F; O- , S- veya N- alkil, O- alkil- O- alkil, O- , S- veya N- alkenil veya O- , S- veya N- alkinil, burada alkil, alkenil ve alkinil sübstitüe veya sübstitüe olmayan C_1 ila C_{10} alkil veya C_2 ila C_{10} alkenil ve alkinil olabilir. Özellikle tercih edilenler $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ ve $O(CH_2)_nON[(CH_2)nCH_3)]_2$'dir, burada n ve m 1 ila yaklaşık 10'dur. Diğer tercih edilen oligonükleotitler aşağıdakilerden birini 2' konumunda içerir: C_1 ila C_{10} düşük alkil, sübstitüe düşük alkil, alkaril, aralkil, O- alkaril veya O- aralkil, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterosikloalkil, heterosikloalkaril, aminoalkilamino, polialkilamino, süsbtitüe silil, bir RNA ayrılan grup, bir haberci grup, bir interkalatör, bir oligonükletitin farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek için bir grup ve benzer özelliklere sahip diğer sübstitüentler. Bir modifikasyon 2'- metoksietoksi (2'- O- $CH_2CH_2OCH_3$), aynı zamanda 2'- O- (2-metoksietil) veya 2'- MOE olarak da bilinir) (Martin vd., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504) yani bir alkoksialkoksi grubu içerir. Diğer modifikasyonlar 2'- dimetilaminooksietoksi, yani bir O(CH2)2ON(CH3)2 grubunu, aynı zamanda 2'- DMAOE ve 2'- dimetilaminoetoksietoksi (2'- DMAEOE) olarak da bilinen grubu içerir.

İlave modifikasyonlar 2'- metoksi (2'- O—CH_3), 2'aminopropoksi (2'- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$) ve 2'- floroyu (2'- F) içerir. Benzer modifikasyonlar aynı zamanda oligonükleotit üzerinde diğer konumlarda, özellikle 3' uçlu nükleotit üzerinde şekerin 3' konumunda veya 2' – 5' bağlı oligonükleotitlerde ve 5' uçlu nükleotitin 5' konumu üzerinde yapılabilir. Oligonükleotitler aynı zamanda pentofurasonil şekerinin yerine siklobutil grupları gibi şeker mimetiklerine de sahip olabilirler. Bu tür modifiye şeker yapılarının hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı

olmamakla birlikte US Pat. No. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633 ve 5,700,920'yi içerir.

Diğer oligonükleotit mimetiklerinde hem şeker hem de internükleosit bağ, yani nükleotit birimlerinin iskeleti yeni gruplarla değiştirilir, ancak baz birimleri uygun bir nükleik asit hedef bileşiği ile hibritleşmesi için korunur. Bu türde bir oligomerik bileşik, mükemmel hibritleşme özelliklerine sahip olduğu gösterilen bir oligonükleotit mimetik bir peptit nükleik asit (PNA) olarak ifade edilir. PNA bileşiklerinde bir oligonükleotitin şeker iskeleti bir amid içeren iskelet ile özellikle bir aminoetilglisin iskeleti ile değiştirilir. Nükleobazlar korunur ve iskeletin amid kısmının aza azot atomlarına doğrudan veya dolaylı olarak bağlanır. PNA bileşiklerinin hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte US Pat. No. 5,539,082; 5,714,331 ve 5,719,262'yi içerir. Ayrıca PNA bileşikleri hakkında bilgi Nielsen vd., (Science, 1991, 254, 1497 – 1500) belgesinde bulunabilir.

Burada açıklanan belirli bazı düzenlemeler fosforotiyoat iskeletlerine sahip oligonükleotitler ve özellikle yukarıda referans verilen US Pat No. 5,489,677'deki- CH2- NH- O- CH2- ,- CH2- N(CH3)- O- CH2- (metilen (metilimino) veya MMI iskeleti olarak ifade edilir)- CH2- O- N(CH3)- CH2- ,- CH2- N(CH3)- N(CH3)- CH2- ve –O- N(CH3)- CH2- CH2- (burada doğal fosfodiester iskeleti –O- P- O- CH2 olarak temsil edilir) ve yukarıda referans verilen US Pat. No. 5,602,240'ın amid iskeletleridir. Ayrıca yukarıda referans verilen US Pat. No. 5,034,506'nın morfolino iskelet yapılarına sahip oligonükleotitleri de tercih edilir.

Şeker grubu aynı zamanda ribozda karşılık gelen karbonunkine göre zıt stereokimyasal konfigürasyona sahip bir veya daha fazla karbon atomunu da içerebilir. Dolayısıyla bir oligonükleotit, örneğin şeker olarak arabinoz içeren nükleotitleri içerebilir. Monomer, şeker üzerinde, örneğin alfa nükleositler üzerinde 1' konumunda bir alfa bağına sahip olabilir. Oligonükleotitler aynı zamanda "abazik" şekerleri de içerebilir ki bunlar C- 1'de bir nükleobazdan yoksundurlar. Bu abazik şekerler aynı zamanda yapılandırıcı şeker atomlarından bir veya daha fazlasını da içerebilirler. Oligonükleotitler aynı zamanda L formunda olan, örneğin L- nükleositler, bir veya daha fazla şeker de içerebilir.

Kimerik Oligonükleotitler

Verilen bir bileşikteki tüm konumların eş dağılımlı bir şekilde modifiye edilmesi gerekmez ve aslında tek bir bileşikte veya bir oligonükleotit içine tek bir nükleosite yukarıda bahsedilen modifikasyonlar dahil edilebilir. Burada bahsedilen belirli bazı tercih edilen oligonükleotitler kimerik oligonükleotitlerdir. "Kimerik oligonükleotitler" veya "kimeralar" buradaki bağlamda her biri en az bir nükleotidden meydana gelen iki veya daha fazla kimyasal olarak ayrı bölgeyi içeren oligonükleotitlerdir. Bu oligonükleotitler tipik olarak bir veya daha fazla yararlı özelliğe (örneğin artan nükleaz direnci, hücreler artan alım, RNA hedefi için artan bağlanma afinitesi) sahip en az bir modifiye nükleotit bölgesi ve RNaz H parçalanması için bir substrat olan bir bölgeyi içerir.

Bir düzenlemede kimerik bir oligonükleotit hedef bağlanma afinitesini artırmak için en az bir bölge içerir. Hedefi için bir oligonükleotitin afinitesi bir oligonükleotit / hedef çiftinin Tm'si ölçülerek rutin olarak belirlenir ki bu sıcaklık oligonükleotit ve hedefin ayrıştığı sıcaklıktır, ayrışma spektrofotometrik olarak saptanır. Tm ne kadar yüksek olursa, oligonükleotitin hedef için afinitesi de o kadar büyük olur. Bir düzenlemede hedef mRNA bağlanma afinitesini artırmak için modifiye edilen oligonükleotitin bölgesi şekerin 2' konumunda modifiye edilen en az bir nükleotit, en çok tercih edilen şekliyle bir 2'- O- alkil, 2'- O- alkil- O- alkil veya 2'- floro modifiye nükleotiti içerir. Bu tür modifikasyonlar rutin olarak oligonükleotitlere dahil edilir ve bu oligonükleotitlerin verilen bir hedefe karşı 2'- deoksioligonükleotite kıyasla daha yüksek Tm'ye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde artan afinitenin etkisi hedef gen ifadesinin oligonükleotit inhibisyonunu büyük ölçüde artırmaktır.

Diğer bir düzenlemede kimerik bir oligonükleotit RNAz H için substrat olarak davranan bir bölgeyi içerir. Elbette oligonükleotitlerin burada açıklanan çeşitli modifikasyonların herhangi bir kombinasyonunu içerebileceği anlaşılmaktadır.

Oligonükleotitlerin burada açıklanan diğer modifikasyonu oligonükleotitin aktivitesini, hücresel dağılımını veya hücresel alımını artıracak şekilde oligonükleotite bir veya daha fazla grubun veya konjugatın kimyasal olarak bağlanmasını içerir.

Teknikte uzman kimseler terapötik etkinlik gibi in vivo kullanım için makul bir ampirik kural, sekansın tiyolanmış bir versiyonu serbest formda çalışıyorsa, aynı sekansın herhangi bir yapıdaki kapsüllenmiş parçacıklarının da etkin olacağıdır. Antisens

terapiye başka türlü yanıt verdiği bilinmeyen durumlarda ve modellerde etkinlik sergileyecek şekilde kapsüllenmiş parçacıklar aynı zamanda daha geniş bir in vivo kullanıma sahip olabilirler. Alanında uzman kimseler bu buluşu uygulayarak, şimdi antisens terapiye yanıt veren eski modeller bulabileceklerini bilmektedirler. Ayrıca atılan antisens sekanslarını veya yapılarını tekrar ziyaret edebilirler ve buluşu uygulayarak etkinliği bulabilirler.

Mevcut buluşla uyumlu olarak kullanılan oligonükleotitler katı faz sentezi için iyi bilinen teknik aracılığıyla kolayca ve rutin bir şekilde yapılabilirler. Bu tür sentezler için ekipman Applied Biosystems da dahil olmak üzere birkaç tedarikçi tarafından satılmaktadır. Bu tür bir sentez için herhangi bir başka araç da kullanılabilir, oligonükleotitlerin gerçek sentezi rutin uygulayıcının yetenekleri dahilindedir. Fosforotiyoatlar ve alkillenmiş türevleri gibi diğer oligonükleotitleri hazırlamak için benzer tekniklerin kullanılması da iyi bilinmektedir.

Bağışıklığı Uyarıcı Oligonükleotitler

Burada tarif edilen lipit partikülleri ile ilişkili nükleik asitler, bir memeliye ya da başka bir hasta olabilen bir kişiye tatbik edildiğinde bir bağışıklık tepkisi uyandırabilen bağışıklık uyarıcı oligonükleotidler (ISS; tek ya da çift sarmallı) dahil olmak üzere bağışıklık uyarıcı olabilir. ISS, örneğin saç tokası sekonder yapılara (bakınız Yamamoto S., ve diğ. (1992) J. Immunol. 148: 4072- 4076), ya da CpG motiflere yol açan bazı palindromların yanı sıra diğer bilinen ISS özellikleri (multi- G etki alanları gibi, bakınız WO 96 / 11266 sayılı belge) içerir.

Bağışıklık yanıtı, doğuştan ya da adaptif bir bağışıklık yanıtı olabilir. Bağışıklık sistemi daha fazla doğuştan gelen bir bağışıklık sistemine ayrılır ve daha sonra ayrıca humoral hücresel bileşenlere ayrılan omurgalıların adaptif bağışıklık sistemini kazanır. Özel düzenlemelerde, bağışıklık yanıtı mukozal olabilir.

Belirli düzenlemelerde, bir nükleik asit olan bir bağışıklık uyarıcı sadece bir lipit partikülü ile kombinasyon halinde uygulandığında yalnızca bağışıklık uyarıcıdır ve kendi "serbest formda" uygulandığında bağışıklık uyarıcı değildir. Mevcut buluşa göre, bu tür bir oligonükleotidin bağışıklık uyarıcı olduğu düşünülmektedir.

Bağışıklık uyarıcı nükleik asitlerin, bir bağışıklık yanıtını uyarmak üzere bir hedef proteinin ekspresyonunu azaltması ya da özellikle bağlanması gerekli olmadığında sekansa özgü olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, belirli bağışıklık uyarıcı nükleik

asitler, doğal olarak oluşan bir gen ya da mRNA'nın bir bölgesine karşılık gelen bir sekansı içerebilir, ancak yine de, sekansa özgü olmayan spesifik bağışıklık uyarıcı nükleik asitler olarak kabul edilebilirler.

Bir düzenlemede, bağışıklık uyarıcı nükleik asit ya da oligonükleotid, en az bir CpG dinükleotidi içerir. Oligonükleotid ya da CpG dinükleotid, metillenmemiş ya da metillenmiş olabilir. Başka bir düzenlemede, bağışıklık uyarıcı nükleik asit, bir metillenmiş sitosine sahip olan en az bir CpG dinükleotid içerir. Bir düzenlemede, nükleik asit, bir tek CpG dinükleotid içermekte olup içerisinde bahsi geçen CpG dinükleotid içindeki sitosin metillenmiştir. Spesifik bir düzenlemede, nükleik asit, sekans 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3' içerir. Alternatif bir düzenlemede, nükleik asit, en az iki CpG dinükleotidi içermekte olup, içerisinde CpG dinükleotidleri içindeki en az bir sitosin metillenmiştir. Ayrıca bir düzenlemede, sekans içinde mevcut olan CpG dinükleotidleri içindeki her bir sitosin metillenmiştir. Başka bir düzenlemede, nükleik asit birçok CpG dinükleotidlerin içermekte, burada bahsi geçen CpG dinükleotidlerin en az biri, bir metillenmiş sitosin ihtiva etmektedir.

Spesifik bir düzenlemede, nükleik asit, sekans 5' TTCCATGACGTTCCTGACGT 3' içerir. Başka bir spesifik düzenlemede, nükleik asit sekansı, sekans 5' TCCATGA**C**GTTCCTGA**C**GT 3' içerir, burada koyu olarak belirtilen iki sitosinler metillenmiştir. Belirli düzenlemelerde, ODN, aşağıda gösterildiği gibi, ODN #1, ODN #2, ODN #3, ODN #4, ODN #5, ODN #6, ODN #7, ODN #8 ve ODN #9'dan oluşan ODN'ler grubu arasından seçilmektedir.

Tablo 4. Örnek Niteliğindeki Bağışıklık Uyarıcı Oligonükleotitler (ODN'ler)

ODN İSMİ	SEK İD	ODN SEKANSI (5'- 3').
ODN1 insan c- myc		5'- T AACGTT G AGGGG CAT- 3
* ODN İm		5'- T AAZGTT GAGGGGCAT- 3
ODN 2		5'- TCCATGACGTTCCTGACGTT- 3

* ODN 2m		5'- TCCATGAZGTTCCTGAZGTT- 3
ODN 3		5'- T AAGCAT ACGGGGTGT- 3
ODN 5		5'- AACGTT- 3
ODN 6		5'- GATGCT GT GT CGGGGTCT CCGGGC- 3'
ODN 7m		5'- TZGTZGTTTT GTZGTTTT GTZGTT- 3'
ODN 8		5'- T CC AGG ACTT CT CTC AGGTT- 3'
ODN 9		5'- T CT CCCAGCGT GCG CC AT- 3'
ODN 10 mürin Hücreler arası Adhezyon		5'- T GCAT CCCCCAGGCCACCAT- 3
ODN 11 insan Hücreler arası Adhezyon		5'- GCCCAAGCTGGCATCCGTCA- 3'
ODN 12 insan Hücreler arası Adhezyon Molekülü-		5'- GCCC AAGCTGGC ATCCGTCA- 3'
ODN 13 insan erb-B- 2		5'- GGT GCTCACTGC GGC- 3'
ODN 14 insan c-myc		5'- AACC GTT GAG GGG CAT- 3'
ODN 15 insan c-myc		5'- TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC- 3'
ODN 16		5'- GTGCCG GGGTCTTCGGGC- 3'
ODN 17 insan		5'- GGACCCT CCT CCGGAGCC- 3'

insülin Büyüme Faktörü 1-Reseptörü		
ODN 18 insan insülin Büyüme Faktörü 1-Reseptörü		5'- TCC TCC GGA GCC AGA CTT- 3'
ODN 19 insan Epidermal Büyüme Faktörü-Reseptörü		5'- AAC GTT GAG GGG CAT- 3'
ODN 20 Epidermal Büyüme Faktörü-Reseptörü		5'- CCGTGGTCA TGCTCC- 3'
ODN 21 insan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü		5'- CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG- 3'
ODN 22 mürin Fosfokinaz C- alfa		5'- CAG CCA TGG TTC CCC CCA ACS'
ODN 23		5'- GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA- 3'
ODN 24 insan Bcl-2		5'- TCT CCCAGCGTGCGCCAT- 3'
ODN 25 insan C-Raf- s		5'- GTG CTC CAT TGA TGC- 3'
ODN #26 insan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü- 1		5'- GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG-CCGAAAGUCUG- 3'

ODN #27		5'- RRCGYY- 3'
ODN #28		5'- AACGTTGAGGGGCAT- 3'
ODN #29		5'- CAACGTTATGGGGAGA- 3'
ODN #30 insan c-myc		5'- T AACGTT G AGGGG CAT- 3'

"Z" ifadesi bir metillenmiş sitosin kalıntısıdır. ODN 14, bir 15- mer oligonükleotid'tir ve ODN 1, bir 16- mer içerisinde ODN 1 yapan 5' ucu üzerine ilave edilen bir timidine sahip aynı oligonükleotid'tir. ODN 14 ve ODN 1 arasındaki biyolojik aktivitede hiçbir farklılık tespit edilmemiştir ve her ikisi de benzer bağışıklık uyarıcı aktiviteyi sergiler (Mui ve diğ., 2001)

Burada tarif edilen kompozisyonlarda ve metotlarda kullanılması için uygun oligonükleotidlerin (ODN'ler) ilave spesifik nükleik asit sekansları, Raney ve diğ., Journal of Pharmacology ve Experimental Therapeutics, 298: 1185- 1192 (2001) sayılı belgede tarif edilmiştir. Bazı uygulamalarda, bunun içinde tarif edilen 5 kompozisyonlarda ve metotlarda kullanılan ODN'ler, bir fosfodiester ("PO") omurgaya ya da bir fosforotioat ("PS") omurgaya ve / veya bir CpG motif içinde en az bir metillenmiş sitosin kalınıtısına sahiptir.

Sahte Oligonükleotitler

Transkripsiyon faktörleri, nispeten kısa bağlanma sekanslarını tanıdıkları için, çevreleyen genomik DNA'nın yokluğunda bile, belirli bir transkripsiyon faktörünün konsensüs bağlanma sekansını taşıyan kısa oligonükleotidler, canlı hücrede gen ifadesini manipüle etmek için araçlar olarak kullanılabilir. Bu strateji, daha sonra hedef faktörü tarafından kabul edilen ve bu tür "sahte oligonükleotidlerin" hücre içi dağıtımını içerir. Transkripsiyon faktörünün DNA- bağlama bölgesinin, tuzak tarafından işgal edilmesi, daha sonra hedef genlerin promoter bölgelerine bağlanamayan transkripsiyon faktörünü meydana getirir. Bu strateji, daha sonra hedef faktörü tarafından tanınan ve bağlanan bu tür "sahte oligonükleotidlerin" hücreler arası

dağıtımını kapsar. Tuzaklar, ya bir transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilen genlerin ifadesinin inhibe etmek için ya da bir transkripsiyon faktörünün bağlanmasıyla bastırılan genlerin yukarı düzenlenmesi için terapötik ajanlar olarak kullanılabilir. Sahte oligonükleotidlerin kullanım örnekleri, Mann ve diğ., J. Clin. Invest., 2000, 106: 1071-1075 sayılı belgede bulunabilir.

Süpermir

Bir süpermir, ribonükleik asidin (RNA) ya da deoksiribonükleik asidin (DNA) ya da her ikisinin veya bunların modifikasyonlarının bir tek sarmallı, çift sarmallı ya da kısmen çift sarmallı oligomeri ya da ya da polimerini ifade etmekte olup, bu bir miRNA ile büyük ölçüde özdeş olan ve kendi hedefine göre antisens olan bir nükleotit sekansına sahiptir. Bu terim, doğal olarak oluşan nükleobazlar, şekerler ve kovalent internükleosit (omurga) bağlarından oluşan oligonükleotidleri ve benzer bir şekilde işlev gören doğal olmayan bir kısım içeren en az bir tanesini içerir. Bunun gibi modifiye edilmiş ya da ikame edilmiş oligonükleotidler, örneğin, geliştirilmiş hücresel geri alımı, nükleik asit hedefi için geliştirilmiş afinite ve nükleusun mevcudiyetinde artan stabilite gibi istenilen özelliklerinden dolayı doğal formlar üzerinde tercih edilir. Tercih edilen bir düzenlemede, süpermir, bir sens sarmalını içermez ve bir başka tercih edilen düzenlemede, süpermir bir önemli uzantıya kendiliğinden melezlenmez. Bunun içinde öne çıkan bir süpermir sekonder yapıya sahip olabilir, ancak fizyolojik koşullar altında büyük ölçüde tek sarmallıdır. Büyük ölçüde tek sarmallı olan süpermir, yaklaşık % 50 süpermirden daha azı (örneğin, yaklaşık % 40, % 30, % 20, % 10, ya da % 5'den daha az) bir kendisi ile çiftleştirilen uzantı için tek sarmallıdır. Süpermir, bir saç tokası segmentini içerebilir, örneğin, sekans, tercih edilen şekliyle 3' ucunda, kendiliğinden melezleşebilir ve bir dubleks bölge, örneğin en az 1, 2, 3, ya da 4 ve tercih edilen şekliyle 8, 7, 6, ya da n nükleotidden daha azını, örneğin, 5 nükleotide sahip bir dubleks bölgesini oluşturur. Dubleks hale getirilen bölge, bir bağlayıcı ile, örneğin bir nükleotid bağlayıcı, örneğin, 3, 4, 5, ya da 6 dTs, örneğin, modifiye edilmiş dTs ile bağlanabilir. Başka bir düzenlemede süpermir, örneğin 3' ve 5' ucunun birinde ya da her ikisinde ya da süpermirin bir ucunda ve terminal olmayan ya da orta ucunda, örneğin 5, 6, 7, 8, 9, ya da 10 uzunlukta nükleotit gibi bir kısa oligo ile dubleks hale getirilir.

miRNA taklitleri

miRNA taklitleri, bir ya da daha fazla miRNA'nın gen susturma yeteneğini taklit etmek için kullanılabilecek moleküllerin bir sınıfını temsil eder. Ayrıca, "mikroRNA taklidi" terimi, RNAi yoluna girebilen ve gen ifadesini düzenleyebilen sentetik kodlayıcı olmayan RNA'lar (yani, miRNA, endojen miRNA kaynağından saflaştırma ile elde edilmez) anlamına gelir. miRNA taklitleri, olgun moleküller (örneğin, tek sarmallı) ya da taklit öncüleri (örneğin, pri- ya da pre- miRNA'lar) olarak tasarlanabilir. miRNA taklitleri, sınırlandırılmaksızın, RNA, modifiye edilmiş RNA, DNA, modifiye edilmiş DNA, kenetli nükleik asitler ya da 2'- O,4'- C- etilen- köprülü nükleik asitleri (ENA) ya da yukarıdakilerin herhangi kombinasyonu (DNA- RNA hibritler dahil olmak üzere) içeren oligonükleotidler dahil olmak üzere nükleik asitten (modifiye edilmiş ya da modifiye edilmiş nükleik asitler) oluşabilir. İlaveten, miRNA taklitleri, taşınma, hücreler arası bölümlendirme, stabilite, özgüllük, işlevsellik, sarmal kullanımı ve / veya potensini etkileyen konjugatları içerebilir. Bir tasarımda, miRNA taklitleri, çift sarmallı moleküllerdir (örneğin, uzunlukça yaklaşık 16 ve yaklaşık 31 nükleotid arasında bir dubleks bölgesi ile) ve verilen bir miRNA'nın olgun sarmalı ile özdeşliğe sahip olan bir ya da daha fazla sekansı içerir. Modifikasyonlar, nükleik asit stabilitesini ve / veya özgüllüğünü arttıran molekül ve internükleotid modifikasyonlarının (örneğin fosfortioat modifikasyonları) biri ya da her iki sarmalı üzerinde 2' modifikasyonları (2'- O metil modifikasyonları ve 2' F modifikasyonları dahil) içerebilir. İlaveten, miRNA taklitleri çıkıntıları içerebilir. Çıkıntılar, her sarmalın ya 3' ya da 5' ucu üzerinde 1- 6 nükleotidden oluşabilir ve stabiliteyi ya da işlevselliğini arttırmak için modifiye edilebilir. Bir düzenlemede, bir miRNA taklidi, 16 ve 31 nükleotit arasında bir dubleks bölgeyi ve aşağıdaki kimyasal modifikasyon kalıpların bir ya da daha fazlasını içerir: sens sarmalı, nüklotidler 1 ve 2'nin 2'- O- metil modifikasyonlarını (sens oligonükleotidlerin 5' ucundan itibaren sayılan) ve Cs ve Us'nin tümünü içerir; antisens sarmal modifikasyonları, Cs ve Us'nin tümünün 2' F modifikasyonunu, oligonükleotidin 5' ucunun fosforilasyonunu ve bir 2 nükleotid 3 ' çıkıntısı ile birlikte stabilize edilmiş internükleotit bağlarını içerebilir.

Antimir ya da miRNA inhibitörü

"Antimir" "mikroRNA inhibitörü", "miR inhibitörü", ya da "inhibitör" terimleri, eşanlamlıdır ve spesifik miRNA'ların yeteneğine müdahale eden oligonükleotidler ya da modifiye edilmiş oligonükleotidler anlamına gelir. Genelde, inhibitörler, RNA, modifiye edilmiş RNA, DNA, modifiye edilmiş DNA, kenetli nükleik asitler (LNA'lar) ya da yukarıdakilerin

herhangi kombinasyonunu içeren oligonükleotidler dahil olmak üzere doğada nükleik asit ya da modifiye edilmiş nükleik asitlerdir. Modifikasyonlar, taşınma, stabilite, özgüllük, işlevsellik, hücreler arası bölümlendirme ya da potensini etkileyen 2' modifikasyonlar (2'- 0 alkil modifikasyonları ve 2' F modifikasyonlar dahil olmak üzere) ve internükleotid modifikasyonlar (örneğin, fosforotioat modifikasyonlar) içerir. İlaveten, miRNA inhibitörleri, taşınma, hücreler arası bölümlendirme, stabilite, ve / veya potensini etkileyen konjugatları içerebilir. İnhibitörler, tek sarmallı, çift sarmallı (RNA / RNA ya da RNA / DNA dubleksleri) ve saç tokası tasarımları dahil olmak üzere çeşitli konfigürasyonları benimseyebilir, genelde, mikroRNA inhibitörleri, hedeflenen miRNA'nın olgun sarmalı (ya da sarmalları) ile tamamlayıcı olan ya da kısmi olarak tamamlayıcı olan bir ya da daha fazla sekansı ya da sekansların kısımlarını içerir, ilaveten, miRNA inhibitörü aynı zamanda, olgun miRNA'nın ters tamamlayıcısı olan sekansa 5' ve 3' yerleştirilmiş ilave sekansları içerir. İlave sekanslar, olgun miRNA'nın türetildiğinden ya da ilave sekansların rastlantısal sekanslar olabildiğinden (A, G, C ya da U karışımına sahip) pri- miRNA içindeki olgun miRNA'ya bitişik olan sekansların ters tamamlayıcısı olabilir. Bazı düzenlemelerde, ilave sekansların biri ya da her ikisi de saç tokası yapısını oluşturabilecek rastlantısal sekanslardır. Ayrıca, bazı düzenlemelerde, miRNA'nın ters tamamlayıcısı olan sekans, saç tokası yapıları ile 5' yanı 'üzerine ve 3' yanı üzerine desteklenmektedir. Çift sarmallı olduğunda, mikro-RNA inhibitörleri, karşıt sarmallar üzerindeki nükleotidler arasında yanlış eşleşmeleri içerir. Bundan başka, miro- RNA inhibitörleri, inhibitörün bir hücreye alınmasını kolaylaştırmak için konjügat kısımlarına bağlanabilir. Örneğin, bir mikro- RNA inhibitörü, bir mikro- RNA inhibitörünün bir hücreye pasif geri alınmasına olanak sağlayan kolesteril 5- (bis(4- metoksifenil) (fenil) metoksi)- 3 hidroksipentilkarbamat)'e bağlanabilir. Saç tokası yapısında miRNA inhibitörleri de dahil olmak üzere, Mmikro-RNA inhibitörleri, detaylı bir şekilde Vermeulen ve diğ., "Double- Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function," RNA 13: 723-730 (2007) ve W02007 / 095387 ve WO 2008 / 036825 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Teknikte sıradan yetkili bir kişi, istenen bir miRNA için veri tabanından bir sekansı seçebilir ve burada açıklanan metotlar açısından yararlı bir inhibitör tasarlar.

U1 adaptörü

U1 adaptörü, poliA alanlarını inhibe eder ve hedef genin terminal eksonundaki bir alana tamamlayıcı olan bir hedef etki alanına ve U1 snRNP'nin U1 küçük nükleer RNA

bileşenine bağlanan bir 'U1 etki alanına' sahip çift işlevselli oligonükleotidlerdir (Goraczniak, ve diğ., 2008, Nature Biotechnology, 27(3), 257- 263 sayılı belge). U1 snRNP, primer olarak pre- mRNA ekson- intron sınırına bağlanarak spliceosome oluşumunda doğrudan erken aşamaları yönlendiren bir ribonükleoprotein kompleksidir (Brown ve Simpson, 1998, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 77- 95 sayılı belge). U1 snRNA baz çiftinin 5' ucuna ait 2- 11 nükleotit, öncü mRNA'nın 5'ss'i ile bağlanır. Bir düzenlemede, burada tarif edilen oligonükleotidler U1 adaptörleridir. Bir düzenlemede, U1 adaptörü, en az bir diğer iRNA ajanı ile kombinasyon halinde tatbik edilebilir.

Oligonükleotit modifikasyonları

Modifiye edilmemiş oligonükleotidler bazı düzenlemelerde optimalden daha az olabilirler, örneğin, modifiye edilmemiş oligonükleotidler, örneğin, hücresel nükleazlar tarafından bozunmaya eğilimli olabilirler. Nükleazlar nükleik asit fosfodiester bağlarını hidrolize edebilir. Bununla birlikte, oligonükleotidlerin kimyasal modifikasyonları gelişmiş özellikler sağlayabilir, ve örneğin, oligonükleotidleri nükleazlara daha stabil hale getirebilir.

Oligonükleotidler alt birimlerin ya da monomerlerinin polimeri olduğundan, aşağıda tarif edilen bir çok modifikasyon, örneğin, bir bazın, bir şekerin, bir fosfat parçasının bir modifikasyonunu ya da bir fosfat kısmının köprü olmayan oksijeni gibi bir oligonükleotid içinde tekrarlanan bir pozisyonda meydana gelir. Verilen bir oligonükleotiddeki tüm pozisyonların üniform olarak modifiye edilmesi gerekli değildir ve aslında daha önce bahsedilen modifikasyonlardan bir tanesinin bir oligonükleotid içindeki tek bir oligonükleotid içine ya da tek bir nükleosit içine bile katılabilecektir.

Bazı durumlarda, oligonükleotiddeki söz konusu pozisyonların tamamında, ancak bir çoğunda modifikasyon meydana gelecektir, ve aslında çoğu durumda meydana gelmeyecektir. Örnek yoluyla, bir modifikasyon sadece 3 'ya da 5' terminal pozisyonunda meydana gelebilir, sadece iç bölgede meydana gelebilir, sadece terminal bölgelerinde meydana gelebilir, örneğin, bir terminal nükleotidinde bir pozisyonda olabilir ya da bir oligonükleotidin son 2, 3, 4, 5, ya da 10 nükleotidinde olabilir. Bir modifikasyon, çift sarmallı bölgede, bir tek sarmallı bölgede ya da her ikisinde de meydana gelebilir.

Bir modifikasyon, sadece çift sarmallı bir oligonükleotid bir çift sarmal bölgesinde meydana gelebilir ya da sadece bir çift sarmallı oligonükleotidin tek bir sarmal bölgesinde meydana gelebilir, örneğin, köprülü olmayan bir oksijen pozisyonunda bir fosforotioat modifikasyonu sadece bir ya da her iki uçta meydana gelebilir, sadece bir terminal bölgelerde meydana gelebilir, örneğin, bir terminal nükleotid üzerindeki bir pozisyonda ya da bir sarmalın son 2, 3, 4, 5, ya da 10 nükleotidlerinde olabilir ya da çift sarmal ve tek sarmal bölgelerde, özellikle uçta meydana gelebilir. 5' ucu ya da uçları fosforlaşabilir.

Burada tarif edilen bir modifikasyon, tek modifikasyon olabilir, ya da çoklu nükleotidler üzerinde yer alan tek modifikasyon türü olabilir, ya da bir modifikasyon, burada tarif edilen bir ya da daha başka modifikasyon ile kombine edilebilir. Burada tarif edilen modifikasyonlar aynı zamanda bir oligonükleotid üzerinde kombine edilebilir, örneğin bir oligonükleotidin farklı nükleotidleri burada tarif edilen farklı modifikasyonlara sahiptir.

Bazı düzenlemelerde, tek sarmal çıkıntılarda, örneğin, bir 5' ya da 3' çıkıntısında ya da her ikisinde de stabiliteyi arttırmak, çıkıntılarda belirli nükleobazları içermek ya da modifiye edilmiş nükleotidler ya da nükleotid yerine geçenleri içermek için özellikle tercih edilir. Örneğin, çıkıntılarda purin nükleotidlerin dahil edilmesi arzu edilebilir. Bazı düzenlemelerde, 3' ya da 5' çıkıntısında bulunan bazların tümü ya da bazıları, örneğin, burada tarif edilen modifikasyon ile modifiye edilecektir. Modifikasyonlar, örneğin, riboz şekerinin 2' OH grubundaki modifikasyonun kullanımını, örneğin, deoksiribonükleotidlerin kullanımını, örneğin, ribonükleotidler yerine deoksitimidin ve fosfat grubu içindeki modifikasyonları, örneğin, fosfotioat modifikasyonlarını içerebilir. Çıkıntıların, hedef sekans ile homolog olması gerekmez.

Spesifik modifikasyonlar aşağıda daha ayrıntılı olarak tartışılmaktadır.

Fosfat Grubu

Fosfat grubu negatif yüklü bir türdür. Yük, iki köprüleme olmayan oksijen atomu üzerinde eşit olarak dağıtılır. Bununla birlikte, fosfat grubu, oksijenlerden birinin farklı bir ikame ile yer değiştirilmesi ile modifiye edilebilir. RNA fosfat omurgalarına yapılan bu modifikasyonun bir sonucu, oligoribonükleotidin nükleolitik bozulmaya karşı direncinin artmasıdır. Bu nedenle teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, bazı

düzenlemelerde simetrik olmayan yük dağılımı ile yüklü olmayan bir bağlayıcı ya da yüklü bir bağlayıcı ile sonuçlanan değişikliklere yol açması arzu edilebilir.

Modifiye edilen fosfat gruplarına ait önekler, fosforotioat, fosforoselenatlar, borano fosfatlar, borano fosfat esterler, hidrojen fosfonatlar, fosforoamidatlar, alkil ya da aril fosfonatlar ve fosfotriesterler içerir. Bazı düzenlemelerde, fosfat omurga kısmındaki köprüleme olmayan fosfat oksijen atomlarından biri aşağıdakilerin herhangi biri ile değiştirilebilir: S, Se, BR_3 (R hidrojen, alkil, arildir), C (yani, bir alkil grubu, bir aril grubu, vb'dir...), H, NR_2 (R hidrojen, alkil, arildir), ya da OR (R hidrojen, alkil ya da arildir). Modifiye edilmemiş bir fosfat grubundaki fosfor atomu akiraldir. Bununla birlikte, köprüleme olmayan oksijenlerden birinin, yukarıdaki atomların biri ya da atom gruplarından biri ile yer değiştirmesi, fosfor atom kiralini meydana getirir; diğer bir deyişle, bu şekilde modifiye edilen bir fosfat grubundaki fosfor atomu, stereojenik bir merkezdir. Stereojenik fosfor atomu, ya "R" konfigürasyona (burada, Rp) ya da the "S" konfigürasyona (burada, Sp) sahip olabilir.

Fosforoditioatların ikisi de sülfür ile yer değiştiren köprüleme olmayan oksijenleri içerir. Fosforoditioatlardaki fosfor merkezi, oligoribonükleotid diastereomerlerin oluşumunu engelleyen akiraldir. Bu nedenle, teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, kiral merkezi elimine eden köprüleme olmayan oksijenlerdeki modifikasyonlar, örneğin fosforoditioat oluşumunu, diastereomer karışımları üretememeleri istenebilir. Böylece, köprüleme olmayan oksijenler bağımsız olarak S, Se, B, C, H, N, ya da OR (R, alkil ya da aril'dir) herhangi biri olabilir.

Fosfat bağlayıcısı aynı zamanda köprüleme oksijenin (yani, fosfatın nükleosit'e bağlandığı oksijen), azot (köprülü fosforoamidatlar), sülfür (köprülü fosforotioatlar) ve karbon (köprülü metilenfosfonatlar) ile yer değiştirilmesiyle modifiye edilebilmektedir. Yer değiştirme, ya bağlantı yapan oksijenlerde ya da her iki bağlantı yapan oksijenlerde meydana gelebilir. Köprülü oksijen bir nükleositin 3'- oksijeni olduğunda, karbon ile yer değiştirme tercih edilir. Köprülü oksijen bir nükleositin 5'- oksijeni olduğunda, azot ile yer değiştirme tercih edilir.

Fosfat Grubunun Yer Değiştirmesi

Fosfat grubu, fosfor içermeyen konnektörler ile yer değiştirilebilir. Teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, yüklü fosfodiester grubunun nükleolitik bozunmada reaksiyon merkezi olduğundan dolayı nötr yapısal taklitler ile yer değiştirmesinin artmış nükleaz

stabilitesi vermesi gerektiğine inanılmaktadır. Tekrar, teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, birkaç uygulamada, yüklü fosfat grubunun bir nötr kısmı ile yer değiştirdiği değişikliklerin sokulması istenebilir.

Fosfat grubunu değiştirebilen kısımlara örnekler, metil fosfonat, hidroksilamino, siloksan, karbonat, karboksimetil, karbamat, amid, tioeter, etilen oksit bağlayıcı, sülfonat, sülfonamit, tioformasetal, formasetal, oksim, metilenimino, metilenmetilimino, metilenhidrazo, metilendimetilhidrazo ve metilenoksimetilimino içerir. Tercih edilen yer değiştirmeler metilenkarbonilamino ve metilenmetilimino gruplarını içerir.

Oksijenlerden en az birinin fosfata bağlandığı değiştirilmiş fosfat bağlarının yeri değiştirilir ya da fosfat grubu, ayrıca "fosfodiester olmayan omurga bağlantısı" olarak da adlandırılan bir fosfor olmayan grup ile değiştirilir.

Ribofosfat Omurganın Yer Değiştirmesi

Oligonükleotid taklit iskeleleri aynı zamanda yapılandırılabilmekte olup, burada fosfat bağlayıcı ve riboz şekeri nükleaz dirençli nükleosit ya da nükleotid vekilleri ile değiştirilir. Teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, tekrarlı bir şekilde yüklü bir omurganın yokluğunun, polianyonları (örneğin nükleazlar) tanıyan proteinlere bağlanmayı azalttığına inanılmaktadır. Tekrar, teori ile sınırlanmak istenmemekle birlikte, bazı uygulamalarda, bazların nötr bir vekil omurga tarafından bağlanmış değişikliklerin ortaya konulması arzu edilebilir. Örnekler, morfilino, siklobütil, pirrolidin ve peptid nükleik asit (PNA) nükleosit vekillerini içerir. Tercih edilen bir vekil bir PNA vekilidir.

Terminal Modifikasyonları

Bir oligonükleotidin 3' ve 5' uçları modifiye edilebilir. Bu tür modifikasyonlar, molekülün 3' ucunda, 5' ucunda ya da her iki ucunda da olabilir. Fosfat grubunun atomlarının bir ya da daha fazlasının ya da tüm bir terminal fosfatın modifikasyonunu ya da yer değiştirilmesini içerebilir. Örneğin, bir oligonükleotidin 3' ve 5' uçları, örneğin, floroforlar (örneğin, piren, TAMRA, flöresin, Cy3 ya da Cy5 boyaları) ya da koruyucu gruplar (örneğin sülfür, silikon, bor ya da ester üzerin bağlı) gibi etiketleme kısımları gibi diğer fonksiyonel moleküler varlıklara konjüge edilebilir. Fonksiyonel moleküler varlıklar, bir fosfat grubu ve / veya bir bağlayıcı vasıtasıyla şekere bağlanabilir. Bağlayıcının terminal atomu, fosfat grubunun ya da C- 3' ya da C- 5' O, N, S ya da şekerin C

grubunun bağlayıcı atomuna bağlanabilir ya da yer değiştirebilir. Alternatif olarak, bağlayıcı bir nükleotid vekilinin (örneğin, PNA'lar) terminal atomuna bağlanabilir ya da yer değiştirebilir.

Bir bağlayıcı / fosfat ile fonksiyonel moleküler varlık- bağlayıcı / fosfat dizisi, bir dsRNA'nın iki sarmalı arasına sokulduğunda, bu dizi bir saç tokası tipi RNA ajanı içinde bir saç tokası RNA halkasının yerini alabilir.

Modüle edici aktivite için faydalı olan terminal modifikasyonları, 5' ucunun fosfat ya da fosfat analogları ile modifikasyonunu içerir. Örneğin, tercih edilen düzenlemelerde, dsRNA'ların antisens sarmalları, 5' fosforile edilmiş olmaktadır ya da 5' ana ucunda bir fosforil analogu içerir. 5'- fosfat modifikasyonları, RISC aracılı gen susturulması ile uyumlu olanları içerir. Uygun modifikasyonlar: 5'- monofosfat ($(HO)_2(O)P$- O- 5'); 5'- difosfat ($(HO)_2(O)P$- O- P(HO)(O)- O- 5'); 5'- trifosfat ($(HO)_2(O)P$- O- (HO)(O)P- O- P(HO)(O)- O- 5'); 5'- guanozin tepesi (7- metillenmiş ya da metillenmemiş) (7m- G- O- 5'- (HO)(O)P- O- (HO)(O)P- O- P(HO)(O)- O- 5'); 5'- adenozin tepesi (Appp), ve herhangi modifiye edilmiş ya da modifiye edilmemiş nükleotid tepe yapısı (N- O- 5'- (HO)(O)P- O- (HO)(O)P- O- P(HO)(O)- O- 5'); 5'- monotiofosfat (fosforotioat; $(HO)_2(S)P$- O- 5'); 5'- monoditiofosfat (fosforoditioat; (HO)(HS)(S)P- O- 5'), S'- fosforotiolat ($(HO)_2(O)P$- S- 5'); oksijen / sülfürün herhangi ilave kombinasyonu monofosfat, difosfat ve trifosfatları yer değiştirir (örneğin 5- alfa- tiotrifosfat, 5'- gama- tiotrifosfat, vb.), 5'- fosforamidatlar ((H0)2(0)P- NH- 5', $(HO)(NH_2)(O)P$- O- 5'), 5'- alkilfosfonatlar (R = alkil = metil, etil, izopropil, propil, vb., örneğin RP(OH)(O)- O- 5'- , $(OH)_2(O)P$- 5'- CH_2-), 5'- alkileterfosfonatlar (R = alkileter = metoksimetil {$MeOCH_2$-), etoksimetil, vb., örneğin, RP(OH)(O)- O- 5'-) içerir.

Terminal modifikasyonları aynı zamanda dağıtımın takip edilmesi için yararlı olabilir ve bu gibi durumlarda ilave edilecek tercih edilen gruplar arasında floroforlar, örneğin, floresin, ya da Alexa boyası, örneğin Alexa 488 bulunmaktadır. Terminal modifikasyonları aynı zamanda geri alımın arttırılması için faydalı olabilir kullanılabilir, bunun için kullanılan modifikasyonlar kolesterol içerir. Terminal modifikasyonları aynı zamanda bir RNA ajanın başka bir kısma çapraz bağlanması için de kullanılabilir; bunun için kullanılan modifikasyonlar mitomisin C içerir.

Nükleobazlar

Adenin, guanin, sitosin ve urasil RNA'da bulunan en yaygın bazlardır. Bu bazlar, RNA'ların geliştirilmiş özelliklere sahip olması için modifiye edilebilir ya da yer değiştirilebilir. Örneğin, nükleaz dirençli oligoribonükleotidler, bu bazlar ile ya da sentetik ve doğal nükleobazlar ile (örneğin, inosin, timin, ksantin, hipoksantin, nubularin, izoguanisin ya da tubersidin) ve yukarıdaki modifikasyonlardan herhangi biri ile hazırlanabilir. Alternatif olarak, yukarıdaki bazlardan herhangi birinin ikame edilmiş ya da modifiye edilmiş analogları, burada açıklanan örneğin "olağandışı bazlar", "modifiye edilmiş bazlar", "doğal olmayan bazlar" ve "evrensel bazlar" kullanılabilir. Örnekler, sınırlandırılmaksızın, 2- aminoadenin, 6- metil ve adenin ve guanin'in diğer alkil türevleri, 2- propil ve adenin ve guanin'in diğer alkil türevleri, 5- halourasil ve sitosin, 5- propinil urasil ve sitosin, 6- azo urasil, sitosin ve timin, 5- urasil (pseudourasil), 4- tiourasil, 5- halourasil, 5- (2- aminopropil) urasil, 5- amino allil urasil, 8- halo, amino, tiol, tioalkil, hidroksil ve diğer 8- ikameli adeninler ve guaninler, 5- triflorometil ve diğer 5- ikameli urasiller ve sitosinler, 7- metilguanin, 5- ikameli pirimidinler, 6- azapirimidinler ve N- 2, N- 6 ve O- 6 ikameli purinler, içeriğinde 2- aminopropiladenin, 5- propinilurasil ve 5- propinilsitosin, dihidrourasil, 3- deaza- 5- azasitosin, 2- aminopurin, 5- alkilurasil, 7- alkilguanin, 5- alkil sitosin, 7- deazaadenin, N6, N6- dimetiladenin, 2,6- diaminopurin, 5- amino- allil- urasil, N3- metilurasil, ikame edilmiş 1,2,4- triazoller, 2- piridinon, 5- nitroindol, 3- nitropirrol, 5- metoksiurasil, urasil- 5- oksiasetik asit, 5- metoksikarbonilmetilurasil, 5- metil- 2- tiourasil, 5- metoksikarbonilmetil- 2- tiourasil, 5- metilaminometil- 2- tiourasil, 3- (3- amino- 3karboksipropil)urasil, 3- metilsitosin, 5- metilsitosin, N^4- asetil sitosin, 2- tiositosin, N6- metiladenin, N6- isopentiladenin, 2- metiltio- N6- isopenteniladenin, N- metilguaninler, ya da O- alkillenmiş bazları dahil olmak üzere içerir. Ayrıca pürinler ve pirimidinler, U.S. Pat. No. 3,687,808 sayılı belgede açıklananları, Concise Ensiklopedia Of Polimer Science Ve Engineering, sayfalar 858- 859, Kroschvvitz, J. I., ed. John VViley & Sons, 1990 sayılı belgelerde açıklananları ve Englisch ve diğ., Angevvandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613 sayılı belgelerde açıklananları içerir.

Katyonik Gruplar

Oligonükleotidlere yönelik modifikasyonlar aynı zamanda bir ya da daha fazla katyonik grubun bir şekere, baza ve / veya fosfat ya da modifiye edilmiş fosfat omurga kısmının fosfor atomuna bağlanmasını içerebilir. Bir katyonik grubu, bir doğal, sıradışı ya da evrensel bir baz üzerinde ornatma yeteneğine sahip herhangi bir atoma bağlanabilir.

Tercih edilen bir pozisyon, hibridizasyona müdahale etmeyen bir, yani, baz eşleştirmesi için gereken hidrojen bağlama etkileşimlerine müdahale etmeyen bir konumdur. Bir katyonik grubu, örneğin, bir şekerin C2' pozisyonda ya da bir siklik ya da asiklik şeker vekilindeki analog pozisyonunda bağlanabilir. Katyonik gruplar, örneğin, protonlu amino grupları, örneğin, O- AMİN (AMİN = NH_2; alkilamino, di alkilamino, heterosiklil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, ya da diheteroaril amino, etilen diamin, poliamino); aminoalkoksi, örneğin, $O(CH_2)_nAMİN$, (örneğin, AMİN = NH_2; alkilamino, dialkilamino, heterosiklil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, ya da diheteroaril amino, etilen diamin, poliamino); amino (örneğin NH_2; alkilamino, di alkilamino, heterosiklil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, diheteroaril amino, ya da amino asit); ya da $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$- AMİN (AMİN = NH_2; alkilamino, di alkilamino, heterosiklil, arilamino, diaril amino, heteroaril amino, ya da diheteroaril amino) arasından türetilenleri içerir.

Bir oligonükleotit içine yerleştirme

Bazı modifikasyonlar tercih edilen şekliyle bir oligonükleotid üzerinde, belirli bir konumda, örneğin bir oligonükleotidin 5 'ya da 3' ucunda ya da bir sarmalın bir iç pozisyonunda yer alabilir. Bir oligonükleotid üzerindeki bir modifikasyonun tercih edilen bir konumu, ajan üzerinde tercih edilen özellikler kazandırabilir, örneğin, belirli modifikasyonların tercih edilen konumları, optimum gen susturma özelliklerine ya da endonükleaz ya da eksonükleaz aktivitesine direncin artmasını sağlayabilir.

Bir oligonükleotidin bir ya da daha fazla nükleotidi bir 2'- 5' bağlantıya sahip olabilir. Bir oligonükleotidin bir ya da daha fazla nükleotidi, ters bağlantılara, örneğin 3'- 3', 5'- 5', 2'- 2' ya da 2- 3' bağlantılara sahiptir.

Bir çift- sarmallı oligonükleotid, en az bir 5'- üridin- adenin- 3' (5'- UA- 3') dinükleotid olup, burada üridin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotid, ya da a terminal 5'- üridin- guanin- S' (5'- UG- 3') dinükleotiddir, burada 5'- üridin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotid, ya da a terminal 5'- sitidin- adenin- 3' (5'- CA- 3') dinükleotiddir, burada 5'- sitidin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotid, ya da a terminal 5'- üridin- üridin- 3' (5'- UU- 3') dinükleotiddir, burada 5'- üridin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotiddir, ya da a terminal 5- sitidin- sitidin- 3' (5'- CC- 3') dinükleotiddir, burada 5'- sitidin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotid, ya da a terminal S- sitidin- üridin- S' (5'- CU- 3') dinükleotiddir, burada 5'- sitidin, bir 2'- modifiye edilmiş nükleotid, ya da bir terminal 5'- üridin- sitidin- 3' (5'- UC-

3') dinükleotiddir, burada 5'- üridin, bir 2- modifiye edilmiş nükleotiddir. Bu modifikasyonlar dahil olmak üzere çift- sarmallı oligonükleotidler özellikle endonükleaz aktiviteye karşı stabilize edilir.

Genel Referanslar

Burada kullanılan oligoribonükleotidler ve oligoribonükleositler katı faz sentezi ile sentezlenebilirler, bakınız örneğin "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (özellikle Bölüm 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Bölüm 2, Oligoribonucleotide synthesis, Bölüm 3, 20'— Methyloligoribonucleotide- s: synthesis and applications, Bölüm 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Bölüm 5, Synthesis of 30 oligonucleotide phosphorodithioates, Bölüm 6, Synthesis of oligo- 21- deoxyribonucleoside methylphosphonates, and. Bölüm 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases sayılı belgeler. Diğer özellikle kullanılan sentetik prosedürler ayıraçlar, bloke etme gruplan ve reaksiyon koşulları, Martin, P., Helv. Chim. Açta, **1995**, 78, 486- 504; Beaucage, S. L. ve Iyer, R. P., Tetrahedron, **1992**, 48, 2223- 2311 ve Beaucage, S. L. ve Iyer, R. P., Tetrahedron, **1993**, 49, 6123- 6194 sayılı belgelerde ya da ya da burada anılan referanslar tarafından tarif edilmektedir. WO 00 / 44895, WO 01 / 75164, ya da WO 02 / 44321 sayılı belgelerde tarif edilen modifikasyonlar burada kullanılabilir.

Fosfat Grubu Referansları

Fosfinat oligoribonükleotidlerin hazırlanması, U.S. Pat. No. 5,508,270 sayılı belgede tarif edilmektedir. Alkil fosfonat oligoribonükleotidlerin hazırlanması, U.S. Pat. No. 4,469,863 sayılı belgede tarif edilmiştir. Fosforamidit oligoribonükleotidlerin hazırlanması, U.S. Pat. No. 5,256,775 ya da U.S. Pat. No. 5,366,878 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Fosfotriester oligoribonükleotidlerin hazırlanması, U.S. Pat. No. 5,023,243 sayılı belgede tarif edilmiştir. Borano fosfat oligoribonükleotid'in hazırlanması, U.S. Pat. No'lar. 5,130,302 ve 5,177,198 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. 3'- deoksi- 3'- amino fosforamidat oligoribonükleotidlerin hazırlanması, U.S. Pat. No. 5,476,925 sayılı belgede tarif edilmiştir. 3'- deoksi- 3'- metilenfosfonat oligoribonükleotidlerin hazırlanması, An, H, ve diğ. J. Org. Chem. 2001, 66, 2789- 2801 sayılı belgede tarif edilmiştir. Sülfür köprülü nükleotidlerin hazırlanması, Sproat ve diğ.

Nucleocides Nucleotides 1988, 7,651 ve Crosstick ve diğ. Tetrahedron Lett. 1989, 30, 4693 sayılı belgelerde tarif edilmiştir.

Şeker Grubu Referansları

2' modifikasyonlarına modifikasyonlar, Verma, S. ve diğ. Annu. Rev. Biochem. **1998**, 67, 99- 134 sayılı belgede ve bunların içindeki tüm referanslarda bulunabilir. Riboza spesifik modifikasyonlar aşağıdaki referanslarda bulunabilir: 2'- fluoro (Kawasaki ve diğ., J. Med. Chem., **1993**, 36, 831- 841), 2'- MOE (Martin, P. Helv. Chim. Acta 1996, 79, 1930- 1938), "LNA" (Wengel, J. Acc. Chem. Res. **1999**, 32, 301- 310).

Fosfat Grubu Referanslarının Yer Değiştirmesi

Metilenmetilimino ile bağlanmış oligoribonükleositler, aynı zamanda burada MMI ile bağlanmış oligoribonükleositler olarak da tanımlanan, metilendimetilhidrazo ile bağlanmış oligoribonükleositler, aynı zamanda burada MDH ile bağlanmış oligoribonükleositler olarak da tanımlanan ve metilenkarbonilamino ile bağlanmış oligonükleositler, aynı zamanda burada amid- 3 ile bağlanmış oligoribonükleositler olarak da tanımlanan ve metilenaminokarbonil ile bağlanmış oligonükleositler, aynı zamanda burada amid- 4 ile bağlanmış oligoribonükleositler olarak da tanımlanmasının yanı sıra mesela MMI ve PO ya da PS bağlantılarının değiştirilmesine sahip karışmış omurga bileşikleri, U.S. Pat. No'lar. 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677 sayılı belgelerde ve yayımlanan PCT başvuruları PCT / US92 / 04294 ve PCT / US92 / 04305 sayılı belgelerde (sırasıyla, WO 92 / 20822 WO ve 92 / 20823 sayılı belgeler olarak yayımlanan) tarif edildiği gibi hazırlanabilir. Formasetal ve tioformasetal ile bağlanmış oligoribonükleositler, U.S. Pat. No'lar. 5,264,562 ve 5,264,564 sayılı belgelerdeki gibi hazırlanabilir. Etilen oksit ile bağlanmış oligoribonükleositler, U.S. Pat. No. 5,223,618 sayılı belgelerdeki gibi hazırlanabilir. Siloksan yer değişimleri, Cormier, J.F. ve diğ. Nucleic Acids Res. **1988**, 16, 4583 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Karbonat yer değişimleri, Tittensor, J.R. J. Chem. Soc. C **1971**, 1933 sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Karboksimetil yer değişimleri, Edge, M.D. ve diğ. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 **1972**, **1991** sayılı belgelerde tarif edilmiştir. Karbamat yer değişimleri, Stirchak, E.P. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 6129 sayılı belgelerde tarif edilmiştir.

Fosfat- Riboz Omurga Referanslarının Yer Değiştirmesi

Siklobütil şeker vekil bileşikleri, U.S. Pat. No. 5,359,044 sayılı belgede tarif edilmiştir. Pirrolidin şeker vekil bileşikler, U.S. Pat. No. 5,519,134 sayılı belgede tarif edilmiştir.

Morfolino şeker vekil bileşikleri, U.S. Pat. No'lar. 5,142,047 ve 5,235,033 sayılı belgelerde ve diğer ilgili patent tarifnamelerde tarif edilmiştir. Peptid Nükleik Asitler (PNA'lar) kendi başına bilinmektedir ve Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23 sayılı belgelerde tanımlanan çeşitli prosedürlere uygun olarak hazırlanabilir. Bunlar ayrıca U.S. Pat. No. 5,539,083 sayılı belgeye göre hazırlanabilir.

Terminal Modifikasyon Referansları

Terminal modifikasyonları, Manoharan, M. ve diğ. Antisens ve Nucleic Acid Drug Development 12, 103- 128 (2002) sayılı belgede ve buradaki referanslarda tarif edilmiştir.

Nükleobazların Referansları

N- 2 ornatılmış purin nükleosit amiditler, U.S. Pat. No. 5,459,255 sayılı belgede tarif edildiği gibi hazırlanabilir. 3- Deaza purin nükleosit amiditler, U.S. Pat. No. 5,457,191 sayılı belgede tarif edildiği gibi hazırlanabilir. 5,6- Ornatılmış pirimidin nükleosit amiditler, U.S. Pat. No. 5,614,617 sayılı belgede tarif edildiği gibi hazırlanabilir. 5- 5 Propinil pirimidin nükleosit amiditler, U.S. Pat. No. 5,484,908 sayılı belgede tarif edildiği gibi hazırlanabilir.

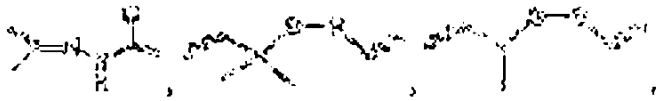
Bağlayıcılar

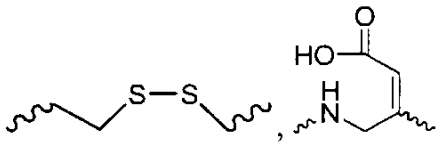
"Bağlayıcı" terimi, bir bileşiğin iki parçasını birleştiren bir organik kısım anlamına gelir. Bağlayıcılar, tipik olarak bir doğrudan bağı ya da oksijen ya da sülfür gibi bir atomu, 10 bir birimi NR^1, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH ya da atomların bir zinciri gibi, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş alkil, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş alkenil, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş alkinil, aril alkil, arilalkenil, arilalkinil, heteroaril alkil, heteroarilalkenil, heteroarilalkinil, heterosiklil alkil, heterosiklilalkenil, heterosiklilalkinil, aril, heteroaril, heterosiklil, siklo alkil, sikloalkenil, alkilaril alkil, alkilarilalkenil, alkilarilalkinil, alkenilaril alkil, alkenilarilalkenil, alkenilarilalkinil, alkinilaril alkil, alkinilarilalkenil, alkinilarilalkinil, alkilheteroaril alkil, alkilheteroarilalkenil, alkilheteroarilalkinil, alkilheteroarilalkenil, alkilheteroarilalkinil, alkenilheteroarilalkil, alkenilheteroarilalkenil, alkenilheteroarilalkinil, alkinilheteroarilalkil, alkinilheteroarilalkenil, alkinilheteroarilalkinil, alkinilheterosiklilalkil, alkilheterosiklilalkenil, alkilhererosiklilalkinil, alkenilheterosiklilalkil, alkenilheterosiklilalkenil, alkenilheterosiklilalkinil, alkinilheterosislilalkil,

alkinilheterosiklilalkenil, alkinilheterosiklilalkinil, alkilaril, alkenilaril, alkinilaril, alkilheteroaril, alkenilheteroaril, alkinilheteroaril içerir, burada bir ya da daha fazla metilen O, S, S(O), SO_2, $N(R^1)_2$, C(O), parçalanabilir bir bağlantı grubu, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş aril, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş heteroaril, ikame edilmiş ya da ikame edilmemiş heterosiklik kesilebilir ya da tarafından sonlandırılabilir; içerisinde R^1 ifadesi hidrojen, asil, alifatik ya da ornatılmış alifatik olmaktadır.

Bir düzenlemede bağlayıcı- $[(P- Q- R)_q- X- (P- Q- R)_q]_q$ "- T- olup, burada:

P, R, T, P', R' ve T'nin her biri bağımsız olarak her oluşum için boş, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH, CH2O; $NHCH(R^a)C(O)$,- C(0)- $CH(R^a)$- NH- , CH = N-

O,  ,

 ya da heterosiklildir;

Q ve Q' her biri, her oluşum için bağımsız olarak boş,- $(CH_2)n$- ,- $C(R^1)(R^2)(CH_2)_n$- ,- $(CH_2)_nC(R')(R^2)$- ,- $(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2$- , ya da $(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NH$- 'dir;

X ifadesi boştur ya da parçalanabilir bir bağlantı grubudur;

R^a'nın her biri H ya da an amino asit yan zinciridir;

R^1 ve R^2'nin her biri bağımsız olarak her oluşum için H, CH_3, OH, SH ya da $N(R^N)_2$'dir;

R^N ifadesinin her biri bağımsız olarak her oluşum için H, metil, etil, propil, izopropil, bütil ya da benzil olmaktadır;

q, q' ve q" her biri bağımsız olarak her oluşum için 0- 20 olmaktadır ve içerisinde tekrarlanan birim aynı ya da farklı olabilir;

n ifadesi bağımsız olarak her oluşum için 1- 20'dir; ve

m ifadesi bağımsız olarak her oluşum için 0- 50'dir.

Bir düzenlemede, bağlayıcı en az bir parçalanabilen bağlantı grup içerir.

Bazı düzenlemelerde, bağlayıcı bir dallanmış bağlayıcıdır. Dallanmış bağlayıcının dallanma noktası en az üç değerlikli olabilir, ancak bir dört değerlikli, bir beş değerlikli ya da altı değerlikli atom olabilir, ya da bu gibi birden fazla değeri sunan bir grup olabilir.

Bazı düzenlemelerde, dallanma noktası,- N,- N{Q)- C,- O- C,- S- C,- SS- C,- C(O)N(Q)- C,- OC(0)N(Q)- C,- N(Q)C(O)- C, ya da- N(Q)C(O)O- C olmaktadır; burada Q ifadesi, bağımsız olarak her oluşum için H ya da opsiyonel olarak ikame edici alkil olmaktadır. Diğer bir düzenlemede, dallanma noktası gliserol ya da gliserol türevidir.

Parçalanabilir Bağlantı Grupları

Bir parçalanabilir bağlantı grubu, hücrenin dışında yeterince stabil olan, fakat bir hedef hücreye giriş üzerine bağlayıcının bir arada tutulduğu iki parçayı serbest bırakmak üzere parçalanır. Tercih edilen bir düzenlemede, parçalanabilir bağlantı grubu, hedef hücresinde en az 10 kat ya da daha fazla, tercih edilen şekliyle 100 kat daha hızlı parçalanabilir ya da bir deneğin kanından ziyade bir ilk referans koşulu altında (ki bu da, örneğin taklidi seçilebilen ya da hücreler arası koşulları temsil eden) ya da bir ikinci referans koşulu altında (ki bu da, örneğin taklidi seçilebilen ya da kanda veya serumda bulunan koşulları temsil eden) parçalanabilir.

Parçalanabilir bağlantı grupları, parçalanabilir ajanlara, örneğin, pH, redoks potansiyel ya da degradatif moleküllerin mevcudiyetine duyarlıdır. Genel olarak, parçalanma ajanları, daha yaygın olan ya da serumda da kandaki aktivitelerin daha yüksek seviyelerde bulunduğunu göstermektedir. Bu tür degradatif ajanlar: belirli substratlar için seçici olan ya da örneğin oksidatif ya da redüktif enzimler dahil olmak üzere substrat spesifitesine sahip olmayan redoks ajanlarını ya da redüksiyon ile bir redoks parçalanma bağlantı grubunu indirgeyebilen hücre içinde mevcut olan merkaptanlar gibi redüktif ajanlar; esterazlar; endozomlar ya da bir asidik ortamo oluşturan, örneğin, bir pH beş ya da daha düşüğü ile elde edilenler, ajanlar; peptidazlar (substrata özgü olabilen) ve fosfatazlar gibi bir genel asit olarak etki ederek bir asit ile parçalanabilen bağlantı grubunu indirgeyebilen ya da hidrolize edebilen enzimleri içerir.

Disülfid bağı gibi bir parçalanabilir bağlantı grubu pH'a duyarlı olabilir. İnsan serumunun pH'ı 7.4 iken, ortalama hücre içi pH oldukça düşük olup pH yaklaşık 7.1-7.3 arasında bir aralıktadır. Endozomlar 5.5- 6.0 aralığında daha asidik pH'a sahiptir ve lizozomlar 5.0 civarında daha da asidik pH değerine sahiptir. Bazı bağlayıcılar, tercih edilen bir pH'da parçalanan ve böylece katyonik lipidi hücrenin içindeki liganddan serbest bırakan, ya da hücrenin istenen bölmesine salınılabilen, parçalanabilir bir bağlantı grubuna sahip olacaktır.

Bir bağlayıcı, belirli bir enzim tarafından parçalanabilen, parçalanabilen bir bağlantı grubunu içerebilir. Bir bağlayıcıya dahil edilen ayrılabilen bağlantı grubunun tipi, hedeflenecek hücreye bağlı olabilir. Örneğin, karaciğeri hedefleyen ligandlar, katyonik lipitlere bir ester grubu içeren bir bağlayıcı ile bağlanabilir. Karaciğer hücreleri esteraz açısından zengindir, bu nedenle bağlayıcı, karaciğer hücresinde esteraz bakımından zengin olmayan hücre tiplerine göre daha etkin bir şekilde parçalanacaktır. Esterazlar bakımından zengin diğer hücre tipleri akciğer, renal korteks ve testisin hücrelerini içerir.

Peptit bağları içeren bağlayıcılar, karaciğer hücreleri ve sinoviyositler gibi peptidazlar bakımından zengin hücre tiplerini hedeflerken kullanılabilir.

Genelde, bir aday parçalanabilir grubun uygunluğu, bir parçalanabilir ajanın (ya da koşulu) aday bağlantı grubunu parçalama kabiliyetinin test edilmesi ile değerlendirilebilir. Ayrıca, diğer hedef olmayan doku ile temas halindeyken ya da kandaki bölünmeye direnme yeteneği bakımından aday parçalanabilir bağlantı grubunun test edilmesi de istenecektir. Böylece, bir birinci ve bir ikinci koşul arasındaki ayrılmaya karşı nispi duyarlılık belirlenebilmekte olup, burada birincisi, bir hedef hücrede parçalanma belirtisi olarak seçilir ve ikincisi, örneğin, kan ya da serum gibi diğer dokularda ya da biyolojik sıvılardaki parçalanma belirtisi olarak seçilir. Değerlendirmeler hücre içermeyen sistemlerde, hücre içinde, hücre kültüründe, organ ya da doku kültüründe ya da bütün hayvanlarda gerçekleştirilebilir. Hücresiz ya da kültür koşullarında başlangıç değerlendirmelerinin yapılması ve bütün hayvanlarda daha fazla değerlendirmenin yapılması ile teyit edilmesi yararlı olabilir. Tercih edilen uygulamalarda, yararlı aday bileşikler, kan ya da serumu ile karşılaştırıldığında (ya da taklit için seçilen in vitro koşullar altında hücre dışı koşullar) hücre içinde (hücre içi koşulları taklit etmek için seçilen in vitro koşullar altında) en az 2, 4, 10 ya da 100 kat daha hızlı parçalanır.

Redoks parçalanabilen bağlantı grupları

Parçalanabilen bağlantı grubunun bir sınıfı, indirgeme ya da oksidasyonu üzerine parçalanan redoks parçalanabilir bağlantı gruplarıdır. İndirgeyici olarak parçalanabilen bağlantı grubunun bir örneği, bir disülfid bağlantı grubudur (- S- S-). Bir aday parçalanabilen bağlantı grubunun uygun bir "indirgeyici olarak parçalanabilen bağlantı grubu" olup olmadığını ya da örneğin bir iRNA parçası ve özel hedefleme ajanı ile kullanım için olup olmadığını belirlemek için, kişi, bunun içinde tarif edilen metotlara

bakabilir. Örneğin, bir aday ditiothreitol (DTT) ile inkübasyon, ya da bir diğer hücrede, örneğin bir hedef hücrede gözlenecek olan bölünme oranını taklit eden teknolojide bilinen reaktifler kullanılarak diğer indirgeyici ajan ile değerlendirilebilir. Adaylar aynı zamanda kan ya da serum koşullarını taklit etmek için seçilen koşullar altında değerlendirilebilir. Tercih edilen bir düzenlemede, aday bileşikleri, kanda en çok % 10 oranında parçalanır. Tercih edilen düzenlemelerde, yararlı aday bileşikler, kan ile karşılaştırıldığında (ya da taklit için seçilen in vitro koşullar altında hücre dışı koşullar) hücre içinde (hücre ipi koşulları taklit etmek için seçilen in vitro koşullar altında) en az 2, 4, 10 ya da 100 kat daha hızlı indirgenebilir. Aday bileşiklerin parçalanma hızı, hücre içi ortamı taklit etmek için seçilen koşullar altında standart enzim kinetiği deneyleri kullanılarak ve hücre dışı ortamı taklit etmek için seçilen koşullarla karşılaştırılarak belirlenebilir.

Fosfat tabanlı parçalanabilir bağlantı grupları

Fosfat tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, fosfat grubunu indirgeyen ya da hidrolize eden ajanlar tarafından parçalanır. Hücre içindeki fosfat gruplarını parçalayan bir ajana ait bir örnek, hücre içindeki fosfatazlar gibi enzimlerdir. Fosfat- bazlı parçalanabilen bağlantı gruplarına örnekler,- O- P(O)(ORk)- O- ,- O- P(S)(ORk)- O- ,- O- P(S)(SRk)- O- ,- S- P(O)(ORk)- O- ,- O- P(O)(ORk)- S- ,- S- P(O)(ORk)- S- ,- O- P(S)(ORk)- S- ,- S- P(S)(ORk)- O- ,- O- P(O)(Rk)- O- ,- O- P(S)(Rk)- O- ,- S- P(O)(Rk)- O- ,- S- P(S)(Rk)- O- ,- S- P(O)(Rk)- S- ,- O- P(S)(Rk)- S- olmaktadır. Tercih edilen uygulamalar,- O- P(O)(OH)- O- ,- O- P(S)(OH)- O- ,- 0- P(S)(SH)- O- ,- S- P(O)(OH)- O- ,- O- P(O)(OH)- S,- S- P(O)(OH)- S- ,- O- P(S)(OH)- S- ,- S- P(S)(OH)- O- ,- O- P(O)(H)- O- ,- O- P(S)(H)- O- ,- S- P(O)(H)- O- ,- S- P(S)(H)- O- ,- S- P(O)(H)- S- ,- O- P(S)(H)- S- olmaktadır, tercih edilen bir uygulama- O- P(O)(OH)- O- olmaktadır. Bu adaylar, yukarıda tarif edilenlere benzer metotlar kullanılarak değerlendirilebilir.

Asitle parçalanabilen bağlantı grupları

Asitle parçalanabilen bağlantı grupları, asidik koşullar altında parçalanan bağlantı gruplarıdır. Tercih edilen uygulamalarda asitle parçalanabilen bağlantı grupları, yaklaşık 6.5 ya da daha düşük (örneğin, yaklaşık 6.0, 5.5, 5.0, ya da daha düşük) bir pH ile asidik bir ortamda parçalanır ya da bir genel asit olarak etki edebilen enzimler gibi ajanlar ile parçalanır. Bir hücrede, endozomlar ve lizozomlar gibi spesifik düşük pH organelleri, asitle parçalanabilen bağlantı grupları için bir parçalanma ortamı

sağlayabilir. Asitle parçalanabilen bağlantı gruplarına örnekler, ancak sınırlandırılmamış olarak, hidrazonlar, esterler, ve amino asitlerin esterlerini içerir. Asitle parçalanabilen gruplar, genel formül- C = NN- , C(O)O, ya da- OC(O) sahiptir. Tercih edilen bir uygulama, esterin (alkoksi grubu) oksijenine bağlanan karbonun, bir dimetil pentil ya da t- bütil gibi bir ikame edilmiş grup, ya da tersiyer grup olduğu bir aril grubu olduğu zamandır. Bu adaylar, yukarıda tarif edilenlere benzer metotlar kullanılarak değerlendirilebilir.

Ester tabanlı bağlantı grupları

Ester tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, hücrede esterazlar ve amidazlar gibi enzimler tarafından parçalanır. Ester tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, alkilen, alkenilen ve alkinilen gruplarının esterlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ester ile parçalanabilen bağlantı grupları, genel formül- C(O)O- , ya da- OC(O)- sahiptir. Bu adaylar, yukarıda tarif edilenlere benzer metotlar kullanılarak değerlendirilebilir.

Peptit tabanlı parçalanan gruplar

Peptid tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, hücrelerdeki peptidazlar ve proteazlar gibi enzimler tarafından parçalanır. Peptid tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, oligopeptidler (örneğin, dipeptidler, tripeptidler vb.) ve polipeptidler verecek şekilde amino asitler arasında oluşturulan peptid bağlarıdır. Peptid tabanlı parçalanabilir gruplar, amid grubunu (- C(O)NH-) içermez. Amid grubu herhangi bir alkilen, alkenilen ya da alkinelen arasında oluşturulabilir. Bir peptit bağı, peptidleri ve proteinleri vermek üzere amino asitler arasında oluşan özel bir amid bağı türüdür. Peptid tabanlı parçalanma grubu genel olarak, peptidleri ve proteinleri vererek amino asitler arasında oluşan peptid bağıyla (yani, amid bağı) sınırlandırılır ve tüm amid işlevsel grubunu içermez. Peptid tabanlı parçalanabilen bağlantı grupları, genel formül $NHCHR^{A}C(O)NHCHR^{B}C(O)$- sahip olup içerisinde R^{A} ve R^{B} ifadeleri, iki komşu amino asitlerin R gruplarıdır. Bu adaylar, yukarıda tarif edilenlere benzer metotlar kullanılarak değerlendirilebilir.

Ligandlar

Çok çeşitli varlıklar bunun içinde tarif edilen oligonükleotidler ve lipidlere bağlanabilir. Tercih edilen parçalar, tercih edilen şekliyle araya giren bir teter vasıtasıyla doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanan, tercih edilen şekliyle kovalent olarak bağlanan ligandlardır.

Tercih edilen düzenlemelerde, bir ligand, içerisine dahil edildiği molekülün ömrünü hedefleyen dağılımı değiştirir. Tercih edilen düzenlemelerde, bir ligand, ligand içermeyen bir tür ile karşılaştırıldığında örneğin, molekül, hücre ya da hücre tipi, bölme gibi, örneğin, bir hücresel ya da organ bölmesi, doku, organ ya da vücut bölgesi gibi seçilmiş bir hedef için geliştirilmiş bir afinite sağlar. Seçilen bir hedef için gelişmiş afinite sağlayan ligandlar da aynı zamanda hedefleme ligandları olarak adlandırılır. Burada tarif edilen lipitlere konjugasyon için tercih edilen ligandlar, hedefleme ligandlarıdır.

Bazı ligandlar endozomolitik özelliklere sahip olabilir. Endozomolitik ligandlar, burada açıklanan endozomun lizisini ve / veya kompozisyonun transportunu, ya da endozomdan hücrenin sitoplazmasına kadar kendi bileşenlerini destekler. Endozomolitik ligand, pH bağımlı membran aktivitesi ve fuzojenisite gösteren bir polianyonik peptid ya da peptidomimetik olabilir. Bazı uygulamalarda, endosomolitik ligand, kendi aktif konformasyonunu endozomal pH'de varsayar. "Aktif" konformasyon, endosomolitik ligandların, bunun içinde açıklanan endosomun lizisini ve / veya kompozisyonun transportunu, ya da endozomdan hücrenin sitoplazmasına kadar kendi bileşenlerini desteklediği bu konformasyondur. Örnek teşkil eden endozomolitik ligandlar, GALA peptidi (Subbarao ve diğ., Biochemistry, 1987, 26: 2964- 2972), EALA peptid (Vogel ve diğ., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581- 1586), ve bunların türevlerini (Turk ve diğ., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56- 68) içerir. Bazı düzenlemelerde, endozomolitik bileşen, pH değerindeki bir değişikliğe yanıt olarak yükte ya da protonasyonda bir değişiklik geçirecek bir kimyasal grup (örneğin, bir amino asit) içerebilir. Endozomolitik bileşen, lineer ya da dallanmış olabilir. Peptit bazlı endosomolitik ligandların örnek primer sekansları, Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Endozomolitik aktiviteye sahip peptitlerin listesi

İsim	Sekans (N ila C)	Ref.
GALA	AALEALAEALEALAEALEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALEALAEA	3
INF- 7	GLFEAIEGFIENGVVEGMIVVDYG	4

Inf HA- 2	GLFGAIAGFIENGVVEGMIDGVVYG	5
diINF- 7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGVVYGC GLF EAI EGFI ENGVV	5
diINF3	GLF EAI EGFI ENGVV EGMI DGGC GLF EAI EGFI ENGVV	6
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC	6
GALA- INF3	GLFEAIEGFIENGVVEGLAEALAEALEALAAGGSC	6
INF- 5	GLF EAI EGFI ENGVV EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGVV EGnI	4

n, norlösin

Referanslar

1. Subbarao ve diğ., Biochemistry, 1987, 26: 2964- 2972.

2. Vogel ve diğ., J. Am. Chem. Soc, 1996, 118: 1581- 1586

3. Turk, M. J., Reddy, J. A. ve diğ. (2002). Characterization of a novel pH- sensitive peptide that enhances drug release from folate- targeted liposomes at endosomal pHs. Biochim. Biophys. Acta 1559, 56- 68.

4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. VVagner, E. (1994). The influence of endosome- disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus- like gene transfer systems, J. Biol. Chem. 269 12918- 12924.

5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. ve diğ. (2002). Functional characterization of an endosome- disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome- entrapped proteins. J. Biol. Chem. 277, 27135- 43.

6. Oberhauser, B., Plank, C. ve diğ. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH- sensitive viral füzyon peptides. Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther. 247- 66.

Tercih edilen ligandlar transport, hibridizasyon ve özgüllük özelliklerini geliştirebilir ve ayrıca doğal olarak modifiye edilmiş oligoribonükleotidin nükleaz direncini de geliştirebilir, ya da burada tarif edilen monomerlerin herhangi bir kombinasyonunu içeren bir polimerik molekül ya da modifiye ribonükleotidlerin nükleaz direncini de geliştirebilir.

Ligandlar genel olarak örneğin, geri alımı geliştirmek için terapötik modifiye edicileri; örneğin dağılımı gözlemlemek için, tanı bileşikleri ya da haberci grupları; çapraz bağlama ajanları; ve nükleaz direnci veren kısımları içerebilir. Genel olarak örnekler, lipidler, steroidler, vitaminler, şekerler, proteinler, peptidler, poliaminler ve peptid taklitleri içerir.

Ligandlar, bir protein (örneğin, insan serum albümini (HSA), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), ya da globulin); bir karbohidrat (örneğin, a dekstran, pullulan, kitin, kitosan, inulin, siklodekstrin ya da hiyalüronik asit); ya da bir lipit gibi doğal olarak oluşan bir maddeyi içerir. Ligand aynı zamanda, bir rekombinant ya da sentetik polimer gibi sentetik molekül, örneğin bir sentetik poliamino asit, bir oligonükleotid (örneğin bir aptamer) olabilir. Poliamino asitlere örnekler, poliamino asidi içermekte olup, bunlar bir polilisin (PLL), poli L- aspartik asit, poli L-glutamik asit, stiren- maleik asit anhidrit kopolimer, poli(L- laktit- ko- glikolied) kopolimer, divinil eter- maleik anhidrit kopolimer, N- (2- hidroksipropil) metakrilamid kopolimer (HMPA), polietilen glikol (PEG), polivinil alkol (PVA), poliüretan, poli (2-etilakrilik asit), N- izopropilakrilamid polimerler, ya da polifosfazindir. Poliaminlere ait örnek: polietilenimin, polilizin (PLL), spermin, spermidin, polyamin, psödopeptid-poliamin, peptidomimetik poliamin, dendrimer polyamin, arjinin, amidin, protamin, katyonik lipid, katyonik porfirin, bir polyaminin kuarternar tuzu ya da bir alfa heliks peptid içerir.

Ligandlar aynı zamanda hedefleme grupları, örneğin, bir hücre ya da doku hedefleme ajanı, örneğin, a lektin, glikoprotein, lipid ya da protein, bir böbrek hücresi gibi özelleştirilmiş bir hücreye bağlanan örneğin, bir antikoru içerir. Bir hedefleme grubu, bir tirotropin, melanotropin, lektin, glikoprotein, sürfaktan protein A, Musin karbohidrat, çok değerli laktoz, çok değerli galaktoz, N- asetil- galaktozamin, N asetil- gulukosamin çok değerli manoz, çok değerli fukoz, glikosilatlanmış poliamino asitler, çok değerli galaktoz, transferrin, bisfosfonat, poliglutamat, poliaspartat, bir lipit, kolesterol, bir steroid, safra asidi, folat, vitamin B12, biotin, bir RGD peptidi, bir RGD peptidi taklidi ya

da bir aptamer olabilir. Tablo 6, hedefleme ligandların ve bunların ilişkili reseptörlerinin bazı örneklerini gösterir.

Tablo 6: Hedefleme Ligandları ve bunların ilişkili reseptörleri

Karaciğer Hücreleri	**Ligand**	**Reseptör**
1) Parenkimal Hücresi (PC) (Hepatositler)	Galaktoz	ASGP- R (Asiologlikoprotein reseptör)
	Gal NAc (n- asetil-galaktosamin)	ASPG- R Gal NAc Reseptörü
	Laktoz	
	Asialofetuin	ASPG- r
2) Sinusoidal Endotelyal Hücresi (SEC)	Hiyaluronan	Hiyaluronan reseptör
	Prokollaien	Prokollaien reseptör
	Negatif olarak yüklü moleküller	Süpürücü reseptörler
	Manoz	Manoz reseptörleri
	N- asetil Glukosamin	Süpürücü reseptörler
	Immünoglobulinler	Fc Reseptörü
	LPS	CD 14 Reseptör
	Insülin	Reseptör aracılı transsitosiz
	Transferrin	Reseptör aracılı transsitosiz
	Albuminler	Spesifik olmayan

	$eker- Albumin konjügatları	
	Manoz- 6- fosfat	Manoz- 6- fosfat reseptörü
3) Kupffer Hücresi (KC)	Manoz	Manoz reseptörleri
	Fukoz	Fukoz reseptörleri
	Albuminler	Spesifik olmayan
	Manoz- albumin konjügatlar	

Ligandlara ait diğer örnekler, boyalar, araya eklenen ajanlar (örneğin, akridinleri), çapraz bağlayıcılar (örneğin, psoralen, mitomisin C), porfirinler (TPPC4, teksaprin, Sapfirin), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (örneğin, fenazin, dihidrofenazin), yapay endonükleazlar (örneğin EDTA), lipofilik moleküller, örneğin, kolesterol, kolik asit, adamantan asetik asit, 1- piren bütirik asit, dihidrotestosteron, 1,3- Bis- O (hekzadesil) gliserol, geraniloksihekzil grubu, hekzadesilgliserol, borneol, mentol, 1,3- propandiol, heptadesil grubu, palmitik asit, miristik asit, O3- (oleoil) litokolik asit, O3- (oleoil) kolenik asit, dimetoksitritil, ya da fenoksazin) ve peptid konjügatları (örneğin, antennapedia peptid, Tat peptid), alkilleyici ajanlar, fosfat, amino, merkapto, PEG (örneğin, PEG-40K), MPEG, [MPEG]$_2$, poliamino, alkil, ornatılmış alkil, radyoaktif işaretli markerler, enzimler, haptenler (örneğin, biyotin), transport / absorpsiyon kolaylaştırıcıları (örneğin, aspirin, E vitamini, folik asit), sentetik ribonükleazlar (örneğin, imidazol, bisimidazol, histamin, imidazol kümeleri, akridin- imidazol konjügatları, tetraazamakrolapların Eu3 + kompleksleri), dinitrofenil, HRP ya da AP içerir.

Ligandlar, proteinler, örneğin, glikoproteinler ya da peptidler, örneğin bir ko- ligand için spesifik bir afiniteye sahip moleküller ya da antikorlar, örneğin, bir kanser hücresi, endotel hücre, ya da kemik hücresi gibi belirli bir hücre türüne bağlanan bir antikor olabilir. Ligandlar aynı zamanda hormonlar ve hormon reseptörleri içerebilir. Aynı zamanda lipidler, lektinler, karbohidratlar, vitaminler, kofaktörler, çok değerli laktoz, çok değerli galaktoz, N- asetil- galaktozamin, N- asetil- gulukosamin çok değerli manoz, çok değerli fukoz, ya da aptamerler gibi peptidik olmayan türleri içerir. Ligand, örneğin,

bir lipopolisakkarit, p38 MAP kinazın bir aktivatörü ya da NF- κB'nin bir aktivatörü olabilir.

Ligand, örneğin, hücrenin hücre iskeletini bozarak, örneğin hücrenin mikrotübüllerini, mikrofilamentlerini ve / veya ara filamentleri bozarak, hücre içerisine iRNA ajanın geri alımını arttırabilen, örneğin bir ilaç gibi bir madde olabilir. İlaç, örneğin, takson, vinkristin, vinblastin, sitokalasin, nokodazol, japlakinolid, latrunculin A, palloidin, swinholide A, indanokin, ya da miyoservin olabilir.

Ligand, örneğin, bir inflamatuar yanıtı aktive ederek iRNA ajanın hücre içine geri alınmasını artırabilir. Bu tür bir etkiye sahip olan örnek teşkil eden ligandlar, tümör nekroz faktör alfa (TNFalfa), interlökin- 1 beta, ya da gama interferon içerir.

Bir bakış açısında, ligand, bir lipit ya da lipit bazlı moleküldür. Böyle bir lipit ya da lipid bazlı bir molekül tercih edilen şekliyle bir serum proteinini, örneğin insan serum albümini (HSA) bağlar. Bir HSA bağlanma ligandı, konjügatın, vücudun böbrek dışı bir hedef dokusu olan bir hedef dokuya dağılmasına izin verir. Örneğin, hedef doku, karaciğerin parankimal hücresi de dahil olmak üzere karaciğer olabilir. HSA'yı bağlayabilen diğer moleküller de aynı zamanda ligand olarak kullanılabilir. Örneğin, neproksin ya da aspirin kullanılabilir. Bir lipit ya da lipit bazlı ligand, (a) konjügatın bozunmasına karşı direncini artırabilir, (b) bir hedef hücre ya da hücre membranı içerisine taşınmayı ya da hedeflemeyi arttırılabilir ve / veya (c) örneğin, HSA gibi bir serum proteine bağlamayı ayarlamak için kullanılabilir.

Bir lipit tabanlı ligand, örneğin konjügatın bir hedef dokuya bağlanmasını kontrol etmek, modüle etmek için kullanılabilir. Örneğin, HSA'ya daha güçlü bağlanan lipit ya da lipit bazlı bir ligandın böbreğe hedeflenmesi daha az olasıdır ve bu nedenle vücuttan temizlenme olasılığı daha düşüktür. HSA'ya daha az kuvvetle bağlanan bir lipit ya da lipit bazlı ligand, konjügatı böbreğe hedeflemek için kullanılabilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, lipid tabanlı ligand HSA'yı bağlar. Tercih edilen şekliyle, HSA'yı, konjügatın tercih edilen şekliyle böbrek dışı bir dokuya dağıtılacağı şekilde yeterli bir afinite ile bağlar. Bununla birlikte, afinitenin, HSA- ligand bağlanmasının tersine çevrilemeyecek kadar güçlü olmaması tercih edilir.

Bir başka tercih edilen düzenlemede, lipid tabanlı ligand HSA'yı zayıf bir şekilde bağlar ya da hiç bağlamaz, öyle ki konjugat tercih edilen şekliyle böbreğe dağıtılacaktır.

Böbrek hücrelerini hedefleyen diğer kısımlar, lipit bazlı liganda ek olarak ya da bunun yerine kullanılabilir.

Bir başka bakış açısında, ligand, örneğin bir prolifere edici hücre gibi bir hedef hücre tarafından alınan örneğin bir vitamin gibi bir kısmıdır. Bunlar, örneğin kanser hücreleri gibi, örneğin, malignant ya da malignant olmayan türe ait istenmeyen hücre proliferasyonu ile karakterize edilen rahatsızlıkları tedavi etmek için özellikle kullanılmaktadır. Örnek teşkil eden vitaminler, vitamin A, E, ve K içerir. Diğer örnek teşkil eden vitaminler, B vitamini içermekte olup, örneğin, kanser hücresi ile alınan folik asit, B12, riboflavin, biyotin, piridoksal ya da diğer vitaminler ya da besinlerdir. Aynı zamanda dahil edilenler HAS, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteindir (HDL).

Başka bir bakış açısında, ligand, bir hücreye geçirgenlik ajanı, tercih edilen şekliyle bir sarmal hücreye geçirgenlik ajanıdır. Bu ajan tercih edilen şekliyle amfipatiktir. Örnek teşkil eden bir ajan, tat ya da antennopedia gibi bir peptiddir. Ajan bir peptid ise, bir peptidilimetik, invertomerler, peptit olmayan ya da psödo- peptid bağları ve D- amino asitlerinin kullanımı da dahil olmak üzere modifiye edilebilir. Sarmal ajan tercih edilen şekliyle bir lipofilik ve bir lipofobik faza sahip olan bir alfa- helisel ajandır.

Ligand, bir peptid ya da peptidomimetik olabilir. Bir peptidomimetik (burada ayrıca bir oligopeptidomimetik olarak da adlandırılır), doğal bir peptide benzer bir tanımlanmış üç boyutlu yapıya katlanabilen bir moleküldür. Peptid ya da peptidomimetik kısım, yaklaşık 5- 50 amino asit uzunluğunda olabilir, örneğin, yaklaşık 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ya da 50 amino uzunluğundadır (Tablo 7'ye bakınız).

Tablo 7. Örnek Teşkil Eden Hücre Geçirgenliği Peptitleri

	Amino asit Sekansı	Referans
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	Derossi et al., J. Biol. Chem. 269: 10444, 1994

Tat fragmanı (48- 60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives et al., J. Biol. Chem., 272: 16010,1997
Sinyal Sekansı tabanlı peptit	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKR KV	Chaloin ve diğ., Biochem. Biophys. Res. Commun., 243: 601,1998
PVEC	LLIILRRRIRKOAHAHSK	Elmquist ve diğ., Exp. Cell Res., 269: 237, 2001
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga ve diğ, FASEB J., 12: 67,1998
Amfifilik model	KLALKLALKALKAALKLA	Oehlke ve diğ, Mol. Ther., 2: 339, 2000
Arg_9	RRRRRRRRR	Mitchell ve diğ., J. Pept. Res., 56: 318,2000
Bakteriyel hücre duvarı geçirgenliği	KFFKFFKFFK	
LL- 37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL RNLVPRTES	
Sekropin PI	SWLSKTAKKLENSAKKRISEGIAIAIQG GPR	
α- defensin	ACYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLWA FCC	
b- defensin	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTC YRGKAKCCK	

Baktenesin	RKCRIVVIRVCR	
PR- 39	RRRPRPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPP GF PPRFPPRFPGKR- NH2	
Indolisidin	ILPWKWPWWPWRR- NH2	

Bir peptid ya da peptidomimetik, örneğin bir hücre geçirgenlik peptidi, katyonik peptid, amfipatik peptid, ya da hidrofobik peptid olabilir (örneğin, primer olarak Tyr, Trp ya da Phe'den oluşur). Peptit kısmı, bir dendrimer peptid, sınırlanmış peptid ya da çapraz bağlanmış peptid olabilir. Başka bir alternatifte, peptit kısmı, bir hidrofobik membran translokasyon sekansı (MTS) içerebilir. Örnek teşkil eden bir hidrofobik MTS içerikli peptid, AAVALLPAVLLALLAP amino asit sekansına sahip RFGF'dir.

Bir hidrofobik MTS içeren bir RFGF analoğu (örneğin, amino asit sekansı AALLPVLLAAP) da bir hedefleme kısmı olabilir. Peptit kısmı, hücre membranları boyunca peptidler, oligonükleotidler ve protein dahil olmak üzere büyük polar molekülleri taşıyabilen bir "iletim" peptidi olabilir. Örneğin, HIV Tat proteini (GRKKRRQRRRPPQ) ve Drosophila Antennapedia proteininin (RQIKIWFQNRRMKWKK) sekanslarının, iletim peptidleri olarak işlev görebildiği bulunmuştur. Bir peptid ya da peptidomimetik, bir faj- görüntüleme kütüphanesinden ya da bir- boncuk- bir- bileşik (OBOC) kombinatoryal kütüphanesinden tanımlanmış bir peptid gibi rastgele bir DNA sekansı tarafından kodlanabilir (Lam ve diğ., Nature, 354: 82- 84, 1991). Tercih edilen şekliyle, bir birleşik monomer birimi yoluyla bir iRNA ajanına tetritlenmiş peptid ya da peptidomimetik, bir arjinin- glisin- aspartik asit (RGD)-peptid, ya da RGD mimik gibi bir hücre hedefleyici peptiddir. Bir peptit kısmı yaklaşık 5 amino asitten yaklaşık 40 amino asit uzunluğa kadar değişebilir. Peptit kısımları, doğrudan konformasyon özelliklerinde stabiliteyi arttırmak için yapısal bir modifikasyona sahip olabilir. Aşağıda açıklanan yapısal modifikasyonlardan herhangi biri kullanılabilir.

Bir RGD peptid kısmı, bir endotelyal hücre ya da bir göğüs kanseri tümör hücresi gibi bir tümör hücresinin hedeflenmesi için kullanılabilir (Zitzmann ve diğ., Cancer Res., 62: 5139- 43, 2002). Bir RGD peptidi, bir iRNA ajanının akciğer, böbrek, dalak, ya da karaciğer de dahil olmak üzere çeşitli diğer dokulara ait olanları hedeflemesini

kolaylaştırabilir (Aoki ve diğ., Cancer Gen Therapy 8: 783- 787, 2001). Tercih edilen şekliyle, RGD peptidi, bir iRNA ajanının böbreğe hedeflenmesini kolaylaştıracaktır. RGD peptidi lineer ya da siklik olabilir, spesifik dokulara hedeflemeyi kolaylaştırmak için modifiye edilebilir, örneğin glikosillenebilir ya da metillenebilmektedir. Örneğin, glikosile edilmiş bir RGD peptidi, $\alpha_v\beta_3$ eksprese eden bir tümör hücresine bir iRNA ajanı iletebilir (Haubner ve diğ., Jour. Nucl. Med., 42: 326- 336, 2001).

Prolifere olan hücrede zenginleştirilmiş işaretleyicileri hedef alan peptitler kullanılabilir. Örneğin, peptid ve peptidomimetikler içeren RGD, kanser hücrelerini, özellikle de bir $\alpha_v\beta_3$ integrini sergileyen hücreyi hedefleyebilir. Böylece, RGD peptidleri, RGD içeren siklik peptidler, D- amino asitler içeren RGD peptidleri ve bunun yanı sıra sentetik RGD mimikleri de kullanılabilir. RGD'ye ilave olarak, $\alpha_v\beta_3$ integrin ligandını hedefleyen diğer kısımlar kullanılabilir. Genel olarak, bu tür ligandlar, hücre ve anjiyogensizlerin çoğaltılmasını kontrol etmek için kullanılabilir. PECAM- 1, VEGF ya da diğer kanser geni, örneğin burada tarif edilen bir kanser geni hedefleyen bu tip ligandların tercih edilen konjügatlardır.

Bir "hücre geçirgenlik peptidi", örneğin bir insan hücresi gibi bir memeli hücresi ya da bir bakteriyel ya da fungal hücre gibi bir mikrobiyal hücre olan bir hücreye nüfuz edebilir. Bir mikrobiyal hücre geçirgenlik peptidi, örneğin, α- helisel lineer bir peptid (örneğin, LL- 37 ya da Ceropin P1), bir disülfid bağı içerikli peptid (örneğin, α- defensin, (β- defensin ya da baktenesin) ya da sadece bir ya da iki dominant amino asitleri içeren (örneğin, PR- 39 ya da indolisidin) bir peptittir. Bir hücre geçirgenlik peptidi aynı zamanda bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerebilir. Örneğin, bir hücre geçirgenlik peptidi, HIV- 1 gp41 ve SV40 büyük T antijeninin NLS'sinin füzyon peptid bölgesinden türetilen MPG gibi bir bipartit amfipatik peptid olabilir (Simeoni ve diğ., Nucl. Acids Res. 31: 2717- 2724, 2003).

Bir düzenlemede, bir hedefleme peptidi, bir iRNA ajanına bağlanır ve / veya taşıyıcı oligomer bir amfipatik α- helisel peptid olabilir. Örnek teşkil eden amfitatik α- helisel peptidler, sekropinler, likotoksinler, paradaksinler, buforin, CPF, bombinin benzeri peptid (BLP), katelisidinler, keratotoksinler, S. dava peptidleri, balık bağırsak antimikrobiyal peptidler (HFIAP'ler), magaininler, brevininler- 2, dermaseptinler, melittinler, plörosidin, H_2A peptidleri, Ksenopus peptidleri, esculentinis- 1 ve caerinler içerir, ancak bunlarla sınırlı tutulmamaktadır. Heliks stabilitesinin bütünlüğünü korumak için bir takım faktörler tercih edilen şekliyle düşünülecektir. Örneğin, maksimum sayıda

heliks stabilizasyon kalıntısı kullanılacaktır (örneğin, leu, ala, ya da lys) ve minimum sayıda heliks destabilizasyon kalıntısı kullanılacaktır (örneğin, prolin, ya da siklik monomerik birimler). Kaplama kalıntısı, göz önüne alınacaktır (örneğin, Giy örnek teşkil eden bir N- kaplama kalıntısıdır ve / veya C- terminal amidasyonu, sarmalın stabilize edilmesi için ekstra bir H- bağı temin etmek üzere kullanılabilir. i ± 3, ya da i ± 4 pozisyonları ile ayrılan karşıt yüklere sahip kalıntılar arasındaki tuz köprülerinin oluşumu, , stabiliteyi sağlayabilir. Örneğin, lisin, arjinin, homo- arjinin, ornitin ya da histidin gibi katyonik kalıntılar, anyonik kalıntılar glutamat ya da aspartat ile tuz köprülerini oluşturabilir.

Peptit ve peptidomimetik ligandlar, doğal olarak oluşan ya da modifiye edilmiş peptidlere sahip olanları, örneğin D ya da L peptidleri; α, β ya da y peptidleri; N- metil peptidleri; azapeptidleri; bir ya da daha fazla amide sahip peptidler, yani, peptid, bir ya da daha fazla üre, tioüre, karbamat, ya da sülfonil üre bağları ile yer değiştirilen bağlar; ya da siklik peptidleri içerir.

Hedefleme ligandı, spesifik bir reseptörü hedefleyebilen herhangi bir ligand olabilir. Örnekleri: folat, Ga1NAc, galaktoz, manoz, manoz- 6P, Ga1NAc kümesi, manoz kümesi, galaktoz kümesi gibi şeker kümeleri ya da bir apatamerdir. Bir küme, iki ya da daha fazla şeker biriminin bir kombinasyonudur. Hedefleme ligandları aynı zamanda, integrin reseptör ligandları, kemokin reseptör ligandları, transferrin, biyotin, serotonin reseptör ligandları, PSMA, endotelin, GCPII, somatostatin, LDL ve HDL ligandları içerir. Ligandlar aynı zamanda nükleik asit, örneğin bir aptamere dayanabilir. Aptamer modifiye edilmeyebilir ya da burada açıklanan modifikasyonların herhangi bir kombinasyonuna sahip olabilir.

Endosomal salınım ajanları, imidazoller, poli ya da oligoimidazoller, PEI'ler, peptidler, füzojenik peptidler, polikarboksilatlar, poliaksiyonlar, maskeli oligo ya da poli katyonları ya da anyonlar, asetaller, poliasetaller, ketaller / poliketyallar, ortoesterler, maskeli ya da maskesiz katyonik ya da anyonik yüklü polimerler, maskeli ya da maskesiz katyonik ya da anyonik yüklü dendrimerleri içerir.

PK modülatör farmakokinetik modülatör anlamına gelir. PK modülatörü, lipofiller, safra asitleri, steroidler, fosfolipid analogları, peptidler, protein bağlama ajanları, PEG, vitaminler vb. içerir. Örnek teşkil eden PK modülatörü, ancak sınırlandırılmamış olarak, kolesterol, yağlı asitler, kolik asit, litokolik asit, di alkilgliseridler, diasilgliserid,

fosfolipidler, sfingolipidler, naproksen, ibuprofen, vitamin E, biotin vb. içerir. Bir dizi fosforotioat bağı içeren oligonükleotidlerin de aynı zamanda serum proteinine bağlandığı bilinmektedir, böylece omurgasında fosforotioat bağlantılarının çoğunu içeren örneğin, yaklaşık 5 baz, 15 baz ya da 20 baz oligonükleotidler gibi kısa oligonükleotidler de aynı zamanda ligandlar olarak kullanılabilir (örneğin PK modüle edici ligandlar olarak).

İlaveten, serum bileşenlerini bağlayan aptamerler (örneğin serum proteinleri) de aynı zamanda PK modüle edici ligandlar olarak kullanılabilir.

Bunun içinde kullanılan diğer ligandlar, 10 Ağustos 2004'te dosyalanan USSN: 10 / 916,185; 21 Eylül 2004'te dosyalanan USSN: 10 / 946,873; 3 Ağustos 2007'de dosyalanmış USSN: 10 / 833,934; 27 Nisan 2005'de dosyalanmış USSN: 11 / 115,989, ve 21 Kasım 2007'de dosyalanmış USSN: 11 / 944,227 sayılı başvurularda tarif edilmektedir.

İki ya da daha fazla ligand mevcut olduğunda, ligandların hepsi aynı özelliklere sahip olabilir, hepsi farklı özelliklere sahip olabilir, ya da bazı ligandlar aynı özelliklere sahipken diğerleri farklı özelliklere sahip olabilir. Örneğin, bir ligand hedefleme özelliklerine sahip olabilir, ya da PK modüle edici özelliklere sahip olan endosomolitik aktiviteye sahip olabilir. Tercih edilen bir uygulamada, tüm ligandlar farklı özelliklere sahiptir.

Ligandlar, oligonükleotidlere çeşitli yerlerde, örneğin, 3'- ucu, 5'- ucu ve / veya bir iç pozisyonda birleştirilebilir. Tercih edilen uygulamalarda, ligand, araya giren bir bağlantı vasıtasıyla oligonükleotidlere bağlanır. Bahsi geçen monomer, büyüyen sarmal içerisine dahil edildiğinde ligand ya da bağlanmış ligand bir monomer üzerinde mevcut olabilir. Bazı uygulamalarda, ligand, bahsi geçen "öncü" monomerin büyüyen sarmala dahil edilmesinden sonra bir "öncü" monomere birleştirilmesi yoluyla birleştirilebilir. Örneğin, bir amino ile sonlandırılan bağlantı (yani, ilgili bir liganda sahip olmayan), örneğin TAP- $(CH_2)_nNH_2$ sahip bir monomer, büyüyen sens ya da antisens sarmalı içerisine birleştirilebilir. Bir sonraki işlemde, yani, öncü monomerin sarmal içerisine birleştirildikten sonra, bir elektrofilik gruba sahip bir ligand, örneğin, bir pentaflorofenil ester ya da aldehit grubu, öncü monomerin bağlantısının terminal nükleofilik grubu ile ligandın elektrofilik grubunun birleştirilmesiyle öncü monomere bağlanabilir.

Çift sarmallı oligonükleotidler için, ligandlar bir ya da her iki sarmala da bağlanabilir. Bazı uygulamalarda, çift sarmallı bir iRNA ajanı, sense sarmalına konjuge edilmiş bir ligand içerir. Diğer uygulamalarda çift sarmallı bir iRNA ajanı, antisens sarmalına konjuge edilmiş bir ligand içerir.

Bazı uygulamalarda, ligandlar, nükleobazlar, şeker kısımları ya da nükleik asit moleküllerin internükleosidik bağlantılarına konjüge edilebilir. Saf nükleobazlara ya da bunların türevlerine konjugasyon, endosiklik ve ekzosiklik atomları dahil olmak üzere herhangi bir konumda oluşabilir. Bazı uygulamalarda, bir purin nükleobazın 2- , 6- , 7- , ya da 8- pozisyonları bir konjugat kısmına bağlanır. Pirimidin nükleobazlar ya da bunların türevlerine konjugasyon, herhangi bir pozisyonda da ortaya çıkabilir. Bazı uygulamalarda, Bir pirimidin nükleobazının 2- , 5- ve 6- pozisyonları bir konjugat kısmı ile ikame edilmiş olabilir. Nükleositlerin şeker kısımlarına konjugasyon herhangi bir karbon atomunda meydana gelebilir. Bir konjugat kısmına bağlanabilen bir şeker kısmının örnek karbon atomları, 2 ', 3' ve 5 'karbon atomlarını içerir. 1 'pozisyonu, bir abasik kalıntıda olduğu gibi bir konjugat kısmına da bağlanabilir. İnternükleosidik bağlantılar da konjugat kısımları taşıyabilir. Fosfor içerikli bağlar için (örneğin, fosfodiester, fosforotioat, fosforoditiyotat, fosforoamidat, ve benzeri), konjugat kısmı, fosfor atomuna doğrudan bağlı ya da fosfor atomuna bağlanan bir O, N, ya da S atomuna bağlanır. Amin- ya da amid- içerikli internükleosidik bağlantılar (örneğin, PNA) için, konjüge kısmı, amin ya da amide ait azot atomuna ya da bir komşu karbon atomuna bağlanabilir.

Oligomerik bileşiklerin konjugatlarını hazırlamak için sayısız metot bulunmaktadır. Genel olarak bir oligomerik bileşik, bir konjugat kısmı üzerinde reaktif bir grup ile reaktif bir grup (örneğin, OH, SH, amin, karboksil, aldehit, ve benzeri) oligomerik bileşik üzerinde temas ettirilerek bir konjügat kısmına bağlanır. Bazı uygulamalarda, bir reaktif grup elektrofilik ve diğeri nükleofiliktir.

Örneğin, bir elektrofilik grubu, karbonil içerikli bir işlevsellik olabilir ve bir nükleofilik grubu, bir amin ya da tiyol olabilir. Bağlanma grupları ile ya da bağlanma grupları olmaksızın nükleik asitlerin ve ilgili oligomerik bileşiklerin konjugasyon metotları, örneğin, Manoharan in Antisens Research ve Applications, Crooke ve LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Bölüm 17 sayılı belgedeki gibi literatürde iyi tarif edilmiştir.

Oligonükleotid konjügatlarının hazırlanmasını öğreten temsili Birleşik Devletler patentleri, , U.S. Pat. No'lar, 4,828,979; 4,948,882; 5,218, 105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578, 717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118, 802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578, 718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904, 582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082, 830; 5,112,963; 5,149,782; 5,214,136; 5,245,022; 5,254, 469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317, 098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510, 475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574, 142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599, 923; 5,599,928; 5,672,662; 5,688,941; 5,714,166; 6,153, 737; 6,172,208; 6,300,319; 6,335,434; 6,335,437; 6,395, 437; 6,444,806; 6,486,308; 6,525,031; 6,528,631; 6,559, 279 içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Tanımlar

Kolaylık olması için tarifnamede, örneklerde ve ekli istemlerde kullanılan belirli bazı terimlerin ve ifadelerin anlamı aşağıda verilmiştir. Bir terimin kullanımında mevcut tarifnamenin diğer kısımları ile bu bölümde sağlanan anlam arasında belirgin bir tutarsızlık varsa, bölümdeki anlam geçerlidir.

"G", "C", "A" ve "U"nun her biri genel olarak sırasıyla guanin, sitosin, adenin ve urasili bir baz olarak içeren bir nükleotiti ifade eder. Ancak "ribonükleotit" veya "nükleotit" aynı zamanda aşağıda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi modifiye bir nükleotiti veya bir vekil ikame grubunu ifade edebilir. Alanında uzman kimse guanin, sitosin, adenin ve urasilin bu tür bir ikame grubu taşıyan bir nükleotit de dahil olmak üzere bir oligonükleotitin baz çiftlenme özelliklerini büyük ölçüde değiştirmeden diğer gruplarla yer değiştirebileceğinin farkındadır. Örneğin sınırlama olmaksızın baz olarak inosin içeren bir nükleotit adenin, sitosin veya urasil içeren nükleotitlerle baz çifti oluşturabilir. Dolayısıyla urasil, guanin veya adenin içeren nükletotitler burada açıklanan nükleotit sekansları içinde, örneğin inosin içeren bir nükleotitle yer değiştirebilir. Bu tür ikame gruplar içeren sekanslar burada açıklanan düzenlemelerdir.

Burada kullanılan "Faktör VII" ile bir Faktör VII mRNA, protein, peptit veya polipeptit ifade edilir. "Faktör VII" terimi aynı zamanda teknikte AI132620, Cf7, koagülasyon faktörü VII öncülü, koagülasyon faktörü VII, FVII, serum protrombin dönüşüm hızlandırıcısı, FVII koagülasyon proteini ve eptacog alfa olarak da bilinir.

Burada kullanıldığı haliyle "hedef sekansı", bir primer transkripsiyon ürününün RNA işlemesinin bir ürünü olan mRNA da dahil olmak üzere genin transkripsiyonu sırasında oluşan bir mRNA'nın nükleotit sekansının bitişik bir bölümünü ifade eder.

Burada kullanıldığı haliyle "bir sekans içeren sarmal", sarmal nükleotit terminolojisi kullanılarak başvurulan sekans tarafından tarif edilen bir nükleotit zincirini içeren bir oligonükleotiti ifade eder.

Burada kullanıldığı haliyle ve aksi belirtilmediği sürece bir nükleotit çifti bağlamında kullanılan "tamamlayıcı" terimi klasik bir Watson- Crick çiftini, yani GC, AT veya AU'yu ifade eder. Aynı zamanda burada tarif edildiği gibi bir veya daha fazla nükleotitin örneğin bir riboz modifikasyonu veya bir fosfat iskelet modifikasyonu ile modifiye edildiği klasik Watson- Crick çiftlerine kadar uzanır. Ayrıca baz çiftlenme özelliklerini büyük ölçüde değiştirmeyen bir inosin veya diğer varlıkları da içerir.

Burada kullanıldığı haliyle ve aksi belirtilmediği sürece "tamamlayıcı" terimi, ikinci bir nükleotit sekansına göre birinci bir nükleotit sekansını tarif etmek için kullanıldığında, alanında uzman kimse tarafından anlaşılacağı üzere birinci nükleotit sekansını içeren bir oligonükleotit veya polinükleotitin ikinci nükletotit sekansını içeren bir oligonükleotit veya polinükleotitle belirli koşullar altında hibritleşme ve bir dupleks yapısı oluşturma yeteneğini ifade eder. Tamamlayıcılık fizyolojik koşullar altında, örneğin bir organizmada karşılaşılabilecek fizyolojik olarak ilgili koşullar altında hibritleşmeye izin veren tam bir tamamlayıcılığı, büyük ölçüde tamamlayıcılığı ve yeterli tamamlayıcılığı içerir. Tam tamamlayıcılık yukarıda tarif edildiği gibi bireysel bir çift için birinci ve ikinci sekansın tüm çiftlerinde tamamlayıcılığı ifade eder. Bir sekans burada açıklanan ikinci bir sekansa göre "büyük ölçüde tamamlayıcı" olduğunda, iki sekans tamamen tamamlayıcı olabilir veya nihai uygulamalarına en uygun koşullar altında hibritleşme yeteneklerini korurken, hibritleşme üzerine bir veya daha fazla uyuşmayan baz çifti oluştururlar ancak genel olarak 4, 3 veya 2'den daha fazlasını oluşturmazlar. Büyük ölçüde tamamlayıcı, aynı amanda zorlayıcı koşullar altında hibritleşme olarak tanımlanabilir, burada zorlayıcı koşullar şunları içerebilir: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 12 saat boyunca 50 ℃ veya 70 ℃ ardından yıkama. Alanında uzman kimse hibritleşen nükleotitlerin nihai uygulamalarına uygun olarak iki sekansın tamamlayıcılığının bir testi için en uygun koşullar setini belirleyebilecektir.

Bununla birlikte hibritleşme üzerine iki oligonükleotit bir veya daha fazla tek sarmal çıkıntısı oluşturmak üzere tasarlandığında, bu tür çıkıntılar tamamlayıcılığın belirlenmesi ile ilgili olarak uyuşmazlık olarak kabul edilmemelidir. Örneğin 21 nükleotit uzunluğunda bir oligonükleotit içeren bir dsRNA ve 23 nükleotit uzunluğunda başka bir oligonükleotit hala "tam tamamlayıcı" olarak adlandırılabilir, burada daha uzun oligonükleotit kısa nükleotit için tam tamamlayıcı olan 21 nükleotit uzunluğunda bir sekans içerir.

"Tamamlayıcı" sekanslar burada kullanıldığı haliyle aynı zamanda, hibritleşme yeteneklerine göre yukarıdaki gereksinimler karşılandığı sürece Watson Crick dışı baz çiftleri ve / veya doğal olmayan ve modifiye nükleotitleri içerebilir veya tamamen bunlardan meydana gelebilir.

Fizyolojik koşullar altında, örneğin bir organizmada karşılaşılabilecek fizyolojik olarak ilgili koşullar altında hibritleşmeye izin vermek üzere "tamamlayıcı", "tam tamamlayıcı", "büyük ölçüde tamamlayıcı" ve yeterli tamamlayıcı terimleri, kullanımları bağlamında anlaşılacağı üzere bir dsRNA'nın sens sarmalı ve antisens sarmalı arasında veya bir dsRNA'nın antisens sarmalı ve bir hedef dizisi arasında baz eşleşmesine göre kullanılabilir.

Burada kullanıldığı haliyle bir mesajcı RNA (mRNA) için "tamamlayıcı, örneğin bunun bir kısmı için büyük ölçüde tamamlayıcı" olan bir polinükleotit, ilgili mRNA'nın (örneğin kodlayan Faktör VII) bitişik bir kısmı için tamamlayıcı, örneğin büyük ölçüde tamamlayıcı olan bir polinükleotiti ifade eder. Örneğin bir polinükleotit, eğer sekans bir mRNA kodlayan Faktör VII'in dokunulmayan bir kısmı için büyük ölçüde tamamlayıcı ise bir Faktör VII mRNA'nın en az bir kısmı için tamamlayıcıdır.

Burada kullanıldığı haliyle "çift sarmallı RNA" veya "dsRNA" , yukarıda tanımlandığı gibi iki anti paralel ve büyük ölçüde tamamlayıcı nükleik asit sarmalı içeren bir dupleks yapısına sahip bir ribonükleik asit molekülünü veya ribonükleik asit moleküllerinin kompleksini ifade eder. Dupleks yapısını oluşturan iki sarmal daha büyük RNA molekülünün farklı kısımları olabilirler ya da ayrı RNA molekülleri olabilirler. İki sarmalın daha büyük bir molekülün parçası olduğu ve dolayısıyla dupleks yapısını oluşturan bir sarmalın 3' ucu ve ilgili diğer sarmalın 5'- ucu arasında dokunulmayan bir zincir ile bağlandığı durumda, bağlayıcı RNA zinciri bir "saç tokası ilmeği" olarak ifade edilir. İki sarmalın dupleks yapısını oluşturan bir sarmalın 3' ucu ve ilgili diğer sarmalın 5'- ucu

arasında dokunulmayan bir zincir dışında bir yolla kovalent olarak bağlandığı durumda, bağlayan yapı bir "bağlayıcı" olarak ifade edilir. RNA sarmalları aynı veya farklı sayıda nükleotitlere sahip olabilirler. Baz çiftlerinin maksimum sayısı dsRNA'nın en kısa sarmalındaki nükleotitlerin sayısıdır. Dupleks yapısına ek olarak bir dsRNA burada kullanıldığı haliyle aynı zamanda bir "küçük inhibitör RNA", "siRNA", "siRNA ajanı", "iRNA ajanı" veya "RNAi ajanı" olarak ifade edilir.

Burada kullanıldığı haliyle bir "nükleotit çıkıntısı" çiftlenmeyen nükleotiti veya dsRNA'nın bir sarmalının bir 3' ucu diğer sarmalın 5'- ucunun ötesine uzandığında ve tam tersi durumda bir dsRNA'nın dupleks yapasından çıkıntı yapan nükleotitlerini ifade eder. "Kör" veya "kör uç" dsRNA'nın ucunda çiftlenmemiş nükleotitlerin yani nükleotit çıkıntısının bulunmadığını ifade eder. Bir "kör uçlu" dsRNA, tam uzunluğu boyunca çift sarmallı olan, yani molekülün hiçbir ucunda nükleotit çıkıntısı bulunmayan bir dsRNA'dır.

"Antisens sarmal" terimi bir hedef sekans için büyük ölçüde tamamlayıcı olan bir bölgeyi içeren bir dsRNA'nın sarmalını ifade eder. Burada kullanıldığı haliyle "tamamlayıcılık bölgesi" terimi, bir sekans için örneğin burada tanımlandığı gibi bir hedef sekansı için büyük ölçüde tamamlayıcı olan antisens sarmalının bölgesini ifade eder. Tamamlayıcılık bölgesinin hedef sekans için tam tamamlayıcı olmadığı durumda, uyuşmazlıklar en çok uç bölgelerde tolere edilirler ve eğer mevcutsa, genel olarak bir uç bölge ya da bölgelerde, örneğin 5' ve / veya 3' ucunun 6, 5, 4, 3 veya 2 nükleotitleri içindedir.

Burada kullanıldığı haliyle "sens sarmalı", antisens sarmalının bir bölgesi için büyük ölçüde tamamlayıcı olan bir bölgeyi içeren bir dsRNA'nın sarmalını ifade eder.

"Kimlik" terimi, sekansların karşılaştırılmasıyla belirlendiği üzere iki veya daha fazla polinükleotit arasındaki ilişkidir. Kimlik aynı zamanda bu tür sekansların iplikçikleri arasındaki eşleşme ile belirlendiği üzere polinükleotit sekansları arasındaki sekans ilgisinin derecesi anlamına da gelir. İki polinükleotit sekansı arasındaki kimliği ölçmek için bir dizi yöntem varsa da, terim alanında uzman kimseler tarafından iyi bilinir (bakınız, örneğin Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); ve Sequence Analysis Primer, Gribskov., M. ve Devereux, J., ed., M. Stockton Press, New York (1991)). Burada kullanıldığı haliyle "büyük ölçüde özdeş", dsRNA'nın sens sarmalı ve hedef genin karşılık gelen kısmı arasında çok yüksek bir

homolojinin (tercih edilen şekliyle % 100 dizi kimliği) var olduğu anlamına gelir. Bununla birlikte % 90'dan fazla veya % 95'den fazla dizi kimliğine sahip dsRNA burada kullanılabilir ve dolayısıyla genetik mutasyona, suş polmorfizmine veya evrimsel ayrışmaya bağlı olarak beklenebilecek sekans varyasyonları tolere edilebilir. % 100 kimlik tercih edilse de dsRNA RNA ve hedef gen arasında tek veya çoklu baz çifti rastlantısal uyuşmazlıkları içerebilir.

Bir dsRNA'yla ilgili olarak "bir hücreye sokma", alanında uzman kimsenin anlayacağı üzere hücreye alımın veya absorbsiyonun kolaylaştırılması anlamına gelir. dsRNA'nın alımı veya absorbsiyonu yardım almayan difüzif veya aktif hücresel proseslerle veya yardımca ajanlarla veya cihazlarla ortaya çıkabilir. Bu durumda hücreye sokma, organizmaya iletimi içerecektir. Örneğin in vivo iletim için dsRNA bir doku bölgesine enjekte edilebilir veya sistemik olarak uygulanabilir. Bir hücreye in vitro olarak getirme elektroporasyon ve lipofeksiyon gibi teknikte bilinen yöntemleri içerir.

Burada Faktör VII geniyle ilgili olarak "susturma" ve "ifadesini inhibe etme" terimleri, birinci Faktör VII geninin transkribe edildiği ve Faktör VII geninin ifadesinin inhibe edileceği şekilde muamele edildiği bir hücre veya hücre grubundan, büyük ölçüde birinci hücre veya hücre grubuna özdeş ancak bu şekilde muamele edilmeyen (kontrol hücreleri) ikinci bir hücre veya hücre grubuna göre, izole edilebilecek Faktör VII geninden gelen mRNA miktarında bir azalmayla ortaya konduğu üzere Faktör VII geninin ifadesinin en azından kısmen baskılanmasını ifade eder. İnhibisyon derecesi genellikle aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$\frac{\text{(kontrol hücrelerindeki mRNA)} - \text{(tedavi edilen hücrelerdeki mRNA)}}{\text{(kontrol hücrelerindeki mRNA)}} \times \% 100$$

Alternatif olarak inhibisyon derecesi fonksiyonel olarak Faktör VII gen transkripsiyonuna bağlanan bir parametrenin, örneğin bir hücre tarafından salgılanan Faktör VII geni tarafından kodlanan protein miktarı veya belirli bir fenotipi gösteren hücre sayısı, örneğin apaptozun azalması cinsinden verilebilir. Prensipte Faktör VII gen susturması yapısal olarak veya genomik mühendislikle ve uygun bir analizle hedefi ifade eden herhangi bir hücrede saptanabilir. Ancak verilen bir siRNA'nın Faktör VII geninin ifadesini belirli bir dereceye kadar inhibe edip etmediğini belirlemek için bir referans gerektiğinde, aşağıdaki Örneklerde sağlanan analizler bu tür bir referans olarak hizmet edebilir.

Örneğin belirli bazı durumlarda Faktör VII geninin ifadesi , burada açıklanan çift sarmallı oligonükleotitlerin uygulanması ile en az yaklaşık % 20, % 25, % 35, % 40 veya % 50 baskılanır. Bir düzenlemede Faktör VII geni burada açıklanan çift sarmallı oligonükleotitin uygulanmasıyla en az yaklaşık % 60, % 70 veya % 80 baskılanır. Daha fazla tercih edilen bir düzenlemede Faktör VII geni burada açıklanan çift sarmallı oligonükleotitin uygulanması ile en az yaklaşık % 85, % 90 veya % 95 baskılanır.

"Tedavi etme", "tedavi" terimleri ve benzerleri bir hastalık veya bozukluktan kurtulmayı veya bunların hafiflemesini ifade eder. Aşağıda geçen diğer hastalık durumlarından herhangi biriyle ilgili olduğu sürece (örneğin trombotik bir bozukluktan başka bir Faktör VII aracılı durum), "tedavi etme", "tedavi" ve benzerleri bu tür durumlarla ilgili en az bir semptomdan kurtulma ya da bunun hafiflemesini veya bu tür bir hastalık durumunun ilerleyişini yavaşlatma veya geri çevirmeyi ifade eder.

"Terapötik olarak ilgili" bir bileşim uygun bir dozda uygulandığında bir hastalığı veya bozukluğu veya bir hastalığın veya bozukluğun bir semptomunu hafifletebilir.

Burada kullanıldığı haliyle "Faktör VII aracılı durum veya hastalık" ve ilgili terimler ve ifadeler uygun olmayan, örneğin normalden büyük Faktör VII aktivitesini ifade eder. Uygun olmayan Faktör VII fonksiyonel aktivitesi, normalde Faktör VII'yi ifade etmeyen hücrelerdeki Faktör VII ifadesinin veya artan Faktör VII bir sonucu olarak ifadesinin (örneğin viral bir hemorajik ateş veya bir trombus semptomuna yol açarak) artabilir. Bir Faktör VII aracılı hastalık durumu veya hastalığa tamamen veya kısmen uygun olmayan Faktör VII fonksiyonel aktivitesi aracılık edebilir. Ancak bir Faktör VII aracılı hastalık durumu veya hastalık, Faktör VII modülasyonunun altta yatan hastalık durumu veya bozukluk üzerinde bir miktar etkiyle sonuçlandığı bir bozukluk veya hastalıktır (örneğin bir Faktör VII inhibitörü en azından bazı hastalarda hastanın esenliğinde bir miktar ilerlemeye yol açar).

Bir "hemorajik ateş", bir viral enfeksiyonun neden olduğu bir hastalık kombinasyonunu içerir. Ateş ve gastrointestinal semptomları tipik olarak kapiler hemoraji takip eder.

Bir "koagülopati" bir deneğin kan pıhtılaşma mekanizmasındaki herhangi bir kusurdur.

Burada kullanıldığı haliyle bir "trombotik bozukluk", istenmeyen kan koagülasyonu ile karakterize edilen herhangi bir bozukluğu içeren, tercih edilen şekliyle istenmeyen FVII ifadesinden kaynaklanan herhangi bir bozukluktur.

Burada kullanıldığı haliyle "terapötik olarak etkili miktar" ve "profilaktik olarak etkili miktar" ifadeleri, viral bir hemorajik ateşin veya bu tür bir bozukluğun, örneğin hemoraj, ateş, güçsüzlük, kas ağrısı, baş ağrısı, enflamasyon veya dolaşım şoku gibi bir açık semptomunun tedavisi, önlenmesi veya idaresinde terapötik bir fayda sağlayan bir miktarı ifade eder. Terapötik olarak etkili olan spesifik miktar sıradan bir tıp hekimi tarafından kolayca belirlenebilir ve teknikte bilinen, örneğin trombotik bozukluğun türü, hastanın hikayesi ve yaşı, hastalığın evresi ve uygulanan diğer ajanlar gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir.

Burada kullanıldığı haliyle bir "farmasötik bileşim", bir dsRNA'nın farmakolojik olarak etkili bir miktarını ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcıyı içerir. Burada kullanıldığı haliyle "farmakolojik olarak etkili miktar", "terapötik olarak etkili miktar" veya basitçe "etkili miktar", bir RNA'nın istenen farmakolojik, terapötik veya önleyici sonucunu üretmek için etkili bir RNA miktarını ifade eder. Örneğin bir hastalık veya bozuklukla ilgili ölçülebilen bir parametrede en az % 25'lik bir azalma olduğunda verilen bir klinik tedavi etkili sayılırsa, bu hastalık veya bozukluğun tedavisi için bir ilacın terapötik olarak etkili bir miktarı bu parametreyi en az % 25 oranında etkilemek için gerekli miktardır.

"Farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" terimi terapötik bir ajanın uygulanması için bir taşıyıcıyı ifade eder. Bu tür taşıyıcılar, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte tuzlu su çözeltisi, tamponlanmış tuzlu su çözeltisi, dekstroz, su, gliserol, etanol ve bunların kombinasyonunu içerir. Terim spesifik olarak hücre kültürü ortamını dışlar. Oral olarak uygulanan ilaçlar için farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte inert seyrelticiler, dağıtıcı ajanlar, bağlayıcı ajanlar, kaydırıcı ajanlar, tatlandırıcı ajanlar, aroma verici ajanlar, renklendirici ajanlar ve koruyucuları içerir. Uygun inert seyrelticiler sodyum ve kalsiyum karbonat, sodyum ve kalsiyum fosfat ve laktozu içerirken, mısır nişastası ve alginik asit uygun dağıtıcı ajanlardır. Bağlayıcı ajanlar nişasta ve jelatini içerirken, kaydırıcı ajan, eğer mevcutsa, genel olarak magnezyum stearat, stearik asit veya talk olacaktır. Eğer istenirse, tabletler gastrointestinal sistemde absorbsiyonu geciktirmek için gliseril monostearat veya gliseril distearat gibi bir malzeme ile kaplanabilir.

Burada kullanıldığı haliyle bir "dönüştürülmüş hücre", bir dsRNA molekülünün ifade edilebileceği bir vektörün sokulduğu bir hücredir.

Nükleik Asit Lipit Partiküllerinin Karakteristikleri

Bazı uygulamalarda, burada tarif edilenler, nükleik özelliklerin bir lipit tabakası içinde kapsüllenmiş olduğu lipit- enkapsüle edilmiş nükleik asit partiküllerin üretilmesine yönelik metotlar ve kompozisyonlardır. siRNA oligonükleotidlerini içeren bu tip nükleik asit- lipit partikülleri, aşağıdakiler dahil olmak üzere çeşitli biyofiziksel parametreler kullanılarak karakterize edilir: (1) ilaç ila lipit oranı; (2) kapsülleme verimliliği; ve (3) parçacık büyüklüğü. Yüksek ilaç ila lipit oranları, yüksek kapsülleme verimliliği, iyi nükleaz direnci ve serum stabilitesi ve kontrol edilebilir partikül büyüklüğü, genel olarak çap olarak 200 nm'den küçük olması arzu edilir. Buna ek olarak, nükleik asitin polimerinin doğasının o kadar önemlidir, çünkü nükleik asitlerin modifikasyonu nükleaz direncini kazandırma pahasında birçok durumda terapötiklerin maliyetini arttırırken birçok durumda sadece sınırlı bir direnç sağlar. Aksi belirtilmediği sürece, bu kriterler aşağıdaki gibi bu tarifnamede hesaplanabilir:

Nükleik asit ila lipit oranı, aynı hacimde lipidin miktarı ile bölünen preparasyonun 30 tanımlanmış bir hacimde nükleik asidin miktarıdır. Bu, mol bazı başına bir mol ya da ağırlık bazı başına bir ağırlık ya da mol bazı başına bir ağırlık üzerine olabilir. Nihai olarak, uygulamaya hazır formülasyonlar, nükleik asit: lipit oranı, diyalizden sonra hesaplanır, kromatografi ve / veya enzim (örn., nükleaz) kadar dış nükleik asidin çıkarılması için kullanılır;

Kapsülleme etkinliği, uygulamaya yetkin formülasyon olan nihai ilaç ila lipit oranı ile bölünen başlangıç karışımının ilaç ila lipit oranı anlamına gelir. Bu nispi verimin bir ölçüsüdür. Mutlak verimin bir ölçüsü için, uygulamaya yetkin formülasyonda biten başlangıç karışımına ilave edilen toplam nükleik asit miktarı da aynı zamanda hesaplanabilir. Formülasyon işlemi sırasında kaybolan lipit miktarı da aynı zamanda hesaplanabilir. Verimlilik, formülasyonun israfı ve masrafının bir ölçüsüdür; ve

Boyut, oluşan partiküllerin boyutunu (çapını) gösterir. Boyut dağılımı, bir Nicomp Model 370 alt mikron partikül boyut ölçücüsü üzerinde yarı elastik ışık saçılımı (QELS) kullanılarak belirlenebilir. Neoplazmlar ve iltihap bölgeleri gibi neo- vaskülarize (sızıntılı) dokulara dağıtılmak üzere 200 nm altındaki partiküller tercih edilir.

Lipit partiküllerini hazırlama yöntemleri

Burada tarif edilen metotlar ve kompozisyonlar, eşlik eden Örneklerde ve aşağıda tarif edilen sentez, hazırlama ve karakterizasyonu olan bazı katyonik lipitleri kullanırlar.

Buna ilaveten, burada tarif edilenler, örneğin, bir nükleik asit gibi terapötik ajan ile ilişkili olanlar dahil olmak üzere lipid partiküllerini hazırlama metotlarıdır. Burada tarif edilen metotlarda, lipitlerin bir karışımı, lipit partiküllerinde enkapsüllenmiş nükleik asidi içeren bir ara maddeyi üretmek için nükleik asidin tamponlu bir sulu çözelti ile kombine edilmekte olup içerisinde enkapsüle edilmiş nükleik asitler, ağırlıkça yaklaşık % 3 ila yaklaşık % 25 arasında, tercih edilen şekliyle ağırlıkça % 5 ila % 15 arasında bir nükleik asit / lipit oranında mevcuttur. Ara madde karışımı, opsiyonel olarak lipit ile enkapsüllenmiş nükleik asit partikülleri elde etmek için boyutlandırılabilir, burada lipit parçaları, tercih edilen şekliyle 30 ila 150 nm bir çapa, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 40 ila 90 nm bir çapa sahip tek lamelli vesiküllerdir. pH daha sonra lipid-nükleik asit partikülleri üzerindeki yüzey yüklerinin en az bir kısmını nötralize etmek için yükseltilir böylece en az kısmen yüzeyden nötrleştirilmiş lipit kapsüllenmiş nükleik asit kompozisyonu sağlanır.

Yukarıda tarif edildiği gibi, bu katyonik lipidlerin birçoğu, amino grubunun pK_a'sının altında bir pH'ta yüklü olan ve pK_a'nın üzerinde bir pH değerinde büyük ölçüde nötr olan amino lipidlerdir. Bu katyonik lipidler titrasyonlu katyonik lipidler olarak adlandırılır ve iki adımlı bir işlem kullanılarak bunun içinde tarif edilen formülasyonlarda kullanılabilir. Birincisi, lipit vesikülleri, nükleik asitlerin mevcudiyetinde titrasyonlu katyonik lipidler ve diğer vesikül bileşenleri ile düşük pH'da oluşturulabilir. Bu şekilde, vesiküller nükleik asitleri kapsüllemekte ve yakalayacaktır. İkincisi, yeni oluşan vesiküllerin yüzey yükü, yani fizyolojik pH ya da daha yüksek mevcut olan pKa titrasyonlu katyonik lipitlerin üzerinde bir seviye ila ortamın pH artmasıyla nötralize edilebilir. Bu işlemin özellikle avantajlı bakış açıları arasında, hem herhangi yüzey absorbe edilmiş nükleik asit hem de nötr bir yüzeye sahip olan nükleik asit taşıyıcı bir aracın çıkarılmasını içerir. Nötr bir yüzeye sahip olan lipozomlar ya da lipid partiküller, katyonik lipozom preparasyonları ile ilişkili olan belirli toksisitelerin önlenmesi için ve dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlenmesinin sakınılması beklenir. Bu tür titrasyonlu katyonik lipitlerin nükleik asit- lipit partiküllerinin formülasyonunda bu kullanımlarına ilişkin ilave detaylar, U.S. Patent 6,287,591 ve U.S. Patent 6,858,225 sayılı belgelerde temin edilmektedir.

Ayrıca, bu şekilde oluşturulan vesiküllerin, nükleik asitlerin yüksek içeriğine sahip tek biçimli vesikül boyutuna sahip formülasyonlar sağladığı da belirtilmektedir. İlaveten,

vesiküller yaklaşık 30 ila yaklaşık 150 nm arasında, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 30 ila yaklaşık 90 nm'lik arasında bir boyut aralığına sahiptir.

Herhangi bir özel teoriye bağlı kalmaksızın, nükleik asit enkapsüllemenin çok yüksek verimliliğinin düşük pH'ta elektrostatik etkileşimin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Asidik pH'da (pH 4.0), vesikül yüzeyi yüklenir ve elektrostatik etkileşimlerle nükleik asitlerin bir kısmını bağlar. Harici asidik tampon daha nötr bir tampon için değiştirildiği zaman (örneğin, pH 7.5), lipid partikülü ya da lipozomunun yüzeyi nötralize olup herhangi bir harici nükleik asitin çıkarılmasına izin verir. Formülasyon süreci hakkında daha detaylı bilgi çeşitli yayınlarda verilmektedir (örneğin, U.S. Patent 6,287,591 ve U.S. Patent 6,858,225 sayılı belgeler).

Yukarıdakilerin ışığında, burada tarif edilenler lipit / nükleik asit formülasyonlarını hazırlama metotlardır. Burada tarif edilen metotlarda, lipitlerin bir karışımı, lipit partiküllerde enkapsüllenmiş nükleik asit içeren bir ara madde karışımını üretmek için nükleik asidin tamponlanmış bir sulu çözelti ile kombine edilmekte olup, örneğin içerisinde enkapsüllenmiş nükleik asitler, ağırlıkça yaklaşık % 10 ila ağırlıkça yaklaşık % 20 bir nükleik asit / lipit oranında mevcut olmaktadır. Ara karışım, opsiyonel olarak lipit ile enkapsüllenmiş nükleik asit partikülleri elde etmek için boyutlandırılabilmekte olup içerisinde lipit kısımları, tercih edilen şekliyle 30 ila 150 nm arasında bir çapa, daha tercih edilen şekliyle yaklaşık 40 ila 90 nm'lik bir papa sahip tek lamelli vesiküllerdir. pH daha sonra, lipid- nükleik asit partikülleri üzerindeki yüzey yüklerinin bir kısmını nötralize etmek için yükseltilir, böylece en az kısmen yüzeyde nötrleştirilmiş lipid kapsüllenmiş nükleik asit kompozisyonu sağlanır.

Bazı düzenlemelerde, lipit karışımı, en az iki lipit bileşeni içerir: burada tarif edilen, lipidin pK_a'nın altında pH değerinde katyonik olan ve pK_a'nın üzerinde pH'ta nötr olan bir pK_a'ya sahip lipidler arasından seçilen bir birinci lipit bileşeni ve lipid- nükleik asit partikül oluşumu sırasında partikül agregasyonunu önleyen lipidler arasından seçilen bir ikinci lipit bileşeni. Belirli düzenlemelerde, amino lipit, burada tarif edilen bir yeni katyonik lipittir.

Burada tarif edilen nükleik asit- lipit partiküllerin hazırlanmasında, lipitlerden oluşan karışım tipik olarak bir organik çözücü içindeki lipitlerin bir çözeltisidir. Lipidlerin bu karışımı daha sonra ince bir film oluşturmak üzere kurutulabilir ya da lipozomlar oluşturmak için sulu bir tampon ile hidratlanmadan önce bir toz oluşturmak üzere

liyofilize edilir. Alternatif olarak, tercih edilen bir metotta, lipit karışımı, etanol gibi suda karışabilir bir alkol içinde çözülebilir ve bir sulu tampona eklenen bu etanolik çözelti, spontan lipozom oluşumu ile sonuçlanır. Birçok uygulamada, alkol, ticari olarak temin edilebilen formda kullanılır, örneğin, etanol mutlak etanol (% 100) olarak ya da % 95 etanol olarak da kullanılabilir, geri kalanı ise sudur. Bu metot, U.S. Patent 5,976,567 sayılı belgede daha ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

Bir örnek teşkil eden uygulamada, lipitlerden oluşan karışım, bir alkol çözücüsü içindeki katyonik lipidler, nötr lipidler (katyonik bir lipid dışında), bir sterol (örneğin, kolesterol) ve PEG ile modifiye edilmiş bir lipidin (bir PEG- DMG ya da PEG- DMA) karışımıdır. Tercih edilen uygulamalarda, lipit karışımı, esasen bir katyonik lipit, nötr lipit, kolesterol ve alkol içinde daha çok tercih edilen şekliyle etanol içinde PEG ile modifiye edilmiş bir lipittir. Ayrıca tercih edilen uygulamalarda, birinci çözelti, yukarıdaki lipitlerden oluşan karışımda belirtilen molar oranlarında yaklaşık % 20- % 70 katyonik lipit: % 5- % 45 nötr lipid: % 20- % 55 kolesterol: % 0.5- % 15 PEG ile modifiye edilmiş lipitten oluşur. Ayrıca yine de tercih edilen uygulamalarda, birinci çözelti, esasen Tablo 1, DSPC, Kol ve PEG- DMG ya da PEG- DMA arasından seçilen, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık % 20- % 60 katyonik lipid: % 5- % 25 DSPC: % 25- % 55 Kol: % 0.5- % 15 PEG- DMG ya da PEG- DMA bir molar oranında bir lipitten oluşur. Belirli uygulamalarda, molar lipit oranı yaklaşık olarak 50 / 10 / 38.5 / 1.5 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG, PEG- DSG ya da PEG- DPG), 57.2 / 7.1 / 34.3 / 1.4 (% mol katyonik lipit / DPPC / Kol / PEG- cDMA), 40 / 15 / 40 / 5 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG), 50 / 10 / 35 / 4.5 / 0.5 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DSG ya da Ga1NAc3- PEG- DSG), 50 / 10 / 35 / 5 (katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG), 40 / 10 / 40 / 10 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA), 35 / 15 / 40 / 10 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA) ya da 52 / 13 / 30 / 5 (% mol katyonik lipit / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA)'dır. Tercih edilen uygulamalara ait bir başka grupta, bu kompozisyonlar içindeki nötr lipit, POPC, DPPC, DOPE ya da SM ile yer değiştirir. Tarifnameye göre, lipid karışımı, nükleik asitleri içerebilen bir tamponlu sulu çözelti ile kombine edilir. Tamponlu sulu solüsyon, tipik olarak tamponun, lipit karışımındaki protonlanabilir lipidin pK_a'sından daha düşük bir pH değerine sahip olduğu bir çözeltidir. Uygun tamponlara ait örnekler, sitrat, fosfat, asetat, ve MES içerir. Özellikle tercih edilen tampon sitrat tamponudur. Tercih edilen tamponlar, kapsüllenmiş olan nükleik asidin

kimyasına bağlı olarak 1- 1000 mM anyon aralığında olabilecektir ve tampon konsantrasyonun optimizasyonu, yüksek yükleme seviyelerinin gerçekleştirilmesi için anlamı olabilir {bakınız, örneğin U.S. Patent 6,287,591 ve U.S. Patent 6,858,225 sayılı belgeler). Alternatif olarak, klorit, sülfat ya da benzeri ile pH 5- 6'ya asitleştirilen saf su kullanılabilir. Bu durumda, % 5 glukoz ilave edilmesi ya da partiküller etanolü uzaklaştırmak için diyalize edildiğinde, pH'ı arttırdığı ya da normal salin gibi farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı ile karıştırıldığı partikül membran boyunca potansiyel ozmotiği dengeleyecek olan bir başka iyonik olmayan çözücünün ilave edilmesi uygun olabilir. Tampon içindeki nükleik asidin miktarı değişebilir, ancak tipik olarak yaklaşık 0.01 mg / mL ila yaklaşık 200 mg / mL, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 0.5 mg / mL ila yaklaşık 50 mg / mL arasında olacaktır.

Lipitlerden oluşan karışım ve terapötik nükleik asitlerin tamponlu sulu çözeltisi ara madde karışım sağlamak için kombine edilmiştir. Ara madde karışımı tipik olarak, kapsüllenmiş nükleik asitlere sahip olan bir lipit taneciklerinin bir karışımıdır. Buna ilaveten, ara madde karışımı aynı zamanda nükleik asitlerin bazı kısmını da içerebilmekte olup negatif yüklü nükleik asitlerin ve lipit partikül yüzeyinde pozitif yüklü lipitlerin iyonik çekimine bağlı olarak lipit partiküllerin yüzeyine (lipozomlar ya da lipid vesiküller) bağlanırlar (Protonlanabilir ilk lipit bileşenini oluşturan amino lipidler veya diğer lipitler, lipit üzerinde protonlanabilir grubun pK_a'sından daha düşük bir pH'a sahip olan bir tampon içinde pozitif olarak yüklenir). Tercih edilen uygulamaların bir grubunda, lipidlerin bir karışımı lipitlerin bir alkol çözeltisidir ve çözeltilerin her birinin hacimleri, kombinasyon halinde, elde edilen alkol içeriğinin hacimce yaklaşık % 20 ila hacimce yaklaşık % 45 arasında olacağı şekilde ayarlanır. Karışımları kombine edilmesine ait metot, çoğunlukla üretilen formülasyonun ölçeğine bağlı olarak çeşitli işlemlerden herhangi birini içerebilir. Örneğin, toplam hacim yaklaşık 10- 20 mL ya da daha az olduğunda, çözeltiler bir test tüpü içinde kombine edilir ve bir vorteks mikseri kullanılarak birlikte karıştırılır. Büyük ölçekli işlemler uygun üretim ölçekli cam eşyalarda gerçekleştirilebilir.

Opsiyonel olarak, lipit karışımı ve terapötik ajanların (nükleik asitler) tamponlanmış sulu çözeltisinin kombine edilmesiyle üretilen lipit ile kapsüllenmiş terapötik ajan (örneğin, nükleik asit) kompleksleri, istenilen bir boyut aralığını ve lipit partikül boyutların nispeten dar dağılımını gerçekleştirmek için boyutlanabilir. Tercih edilen şekliyle, bunun içinde temin edilen kompozisyonlar yaklaşık 70 ila yaklaşık 200 nm,

daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 90 ila yaklaşık 130 nm arasında bir ortalama papa sahip olacaklardır. Lipozomları istenilen boyuta getirmek için çeşitli teknikler mevcuttur. Bir boyutlama metodu, U.S. Pat. No. 4,737,323 sayılı belgede tarif edilmiştir. Ya banyo ya da prob sonikasyon ile bir lipozom süspansiyonun ultrasonik banyoda tutulması, boyutu yaklaşık 0,05 mikrondan küçük olan küçük tek katmanlı vesiküllere (SUVlar) indirgenmiş bir progresif boyutu üretir. Homojenizasyon, büyük lipozomları daha küçük olanlara parçalamak için enerji kesmeye dayanan başka bir metottur. Tipik bir homojenizasyon prosedüründe, çok katmanlı vesiküller, tipik olarak yaklaşık 0.1 ve 0.5 mikron arasında seçilen lipozom büyüklükleri gözlenene kadar standart bir emülsiyon homojenleştirici içinden yeniden sirküle edilir. Her iki metotta, partikül boyutu dağılımı, konvansiyonel lazer ışını partikül boyutu tayini ile izlenebilir. Buradaki belirli metotlar için, ekstrüzyon, tek biçimli bir vesikül boyutu elde etmek için kullanılır.

Bir küçük gözenekli polikarbonat membran ya da bir asimetrik seramik membran boyunca lipozom kompozisyonların ekstrüzyonu, nispeten iyi tanımlanmış bir boyut dağılımı ile sonuçlanır. Tipik olarak, süspansiyon, arzu edilen lipozom kompleksinin boyut dağılımına ulaşılana kadar bir veya daha fazla kez membran doğrultusunda çevrilir. Lipozomlar, lipozom boyutunda kademeli bir azalma sağlamak için başarılı bir şekilde daha küçük gözenekli membran boyunca ekstrüde edilebilir. Bazı durumlarda, oluşturulan lipit- nükleik asit kompozisyonları herhangi bir boyutlandırma olmaksızın kullanılabilir.

Belirli uygulamalarda, burada tarif edilen metotlar ayrıca, lipit- nükleik asit kompozisyonların lipit kısımları üzerindeki yüzey yüklerinin en azından bazılarını nötralize etmenin bir adımını içerir. Yüzey yüklerini en azından kısmen nötralize ederek, kapsüllenmemiş nükleik asit lipit partikülü yüzeyinden serbest bırakılır ve konvansiyonel teknikler kullanılarak kompozisyondan çıkarılabilir. Tercih edilen şekliyle, kapsüllenmemiş ve yüzeye adsorbe edilmiş nükleik asitler, tampon çözeltilerinin değişimi yoluyla elde edilen kompozisyonlardan çıkarılır. Örneğin, bir HEPES- tamponlu şalin (HBS pH yaklaşık 7.5) çözeltisi ile bir sitrat tamponu (kompozisyonları oluşturmak için kullanılan pH yaklaşık 4.0) yer değiştirilmesi, lipozom yüzeyinin nötralizasyonu ile sonuçlanır ve nükleik asit yüzeyden salınır. Salınan nükleik asit daha sonra standart metotlar kullanılarak kromatografiyle çıkarılabilir ve

daha sonra kullanılan lipidin pK_a'sının üzerinde bir pH'a sahip bir tampona dönüştürülebilir.

Opsiyonel olarak, lipit vesikülleri (yani, lipit partikülleri), nükleik asit ilavesinden önce yukarıda tarif edilen metotların herhangi biri kullanılarak boyutlandırılmış bir sulu tamponda hidrasyon ile oluşturulabilir. Yukarıda tarif edildiği üzere, sulu tampon, amino lipitin pK_a'sının altında bir pH'ta olmalıdır. Daha sonra bu boyutlandırılmış, önceden oluşturulmuş vesiküllere nükleik asitlerin bir çözeltisi ilave edilir. Nükleik asitlerin bu tür "önceden oluşturulmuş" vesiküller içine kapsüllenmesine izin vermek için karışım etanol gibi bir alkol içermelidir. Etanol durumunda, yaklaşık % 20 (ağ. / 10 ağ.) ila yaklaşık % 45 (ağ. / ağ.) arasında konsantrasyonunda mevcut olmalıdır. Buna ilaveten, sulu tampon- etanol karışımında önceden oluşturulmuş vesiküller ve nükleik asit karışımının, lipid vesiküllerin kompozisyonuna ve nükleik asitin doğasına bağlı olarak yaklaşık 25 °C ila yaklaşık 50 °C arasında bir sıcaklığa ısıtılması gerekli olabilir. Teknikte ortalama tecrübeye sahip kişilerin açıkça göreceği üzere, kapsülleme işleminin lipit vesiküllerin arzu edilen bir seviyede nükleik asit elde etmek için optimizasyonu, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık gibi değişkenlerin manipüle edilmesini gerektirecektir. Nükleik asit kapsülleme için uygun koşulların örnekleri, Örneklerde verilmiştir. Nükleik asitler önceden oluşturulmuş vesiküller içinde kapsüllendikten sonra, dış pH, yüzey yükünü kısmen nötralize edecek şekilde arttırılabilir. Enkapsüle edilmemiş ve yüzeyi absorbe edilen nükleik asitler yukarıda açıklandığı gibi çıkarılabilir.

Kullanım Yöntemi

Burada tarif edilen lipit tanecikleri, in vitro ya da in vivo olarak bir terapötik ajanı bir hücreye vermek için kullanılabilir. Belirli uygulamalarda, terapötik ajan, burada tarif edilen bir nükleik asit- lipit partikülü kullanılarak bir hücreye verilen bir nükleik asittir. Burada tarif edilen lipid partiküllerinin ve ilgili farmasötik kompozisyonlarına ait çeşitli metotların aşağıdaki tarifleri, nükleik asit- lipit partikülleri ile ilgili açıklama ile örneklenirken, bu metotların ve kompozisyonların, herhangi bir terapötik ajanın bu tür bir tedaviden fayda sağlayacak herhangi bir hastalık ya da bozukluğunun tedavisi için verilmesi için kolayca adapte edilebilir.

Bazı uygulamalarda burada tarif edilenler, bir nükleik asitin bir hücreye sokulması için metotlardır. Hücre içine sokulmak üzere tercih edilen nükleik asitler siRNA, immün

stimüle edici oligonükleotidler, plazmidler, antisens ve ribozimlerdir. Bu metotlar, burada tarif edilen partiküllerin ya da kompozisyonların, hücrelerarası dağıtımın gerçekleşmesi için yeterli bir süre boyunca hücre ile temas ettirilmesiyle gerçekleştirilebilir.

Burada tarif edilen kompozisyonlar hemen hemen her hücre türüne örneğin, HeLa, HCTI 16, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87, ve PC3 hüre dizileri içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan tümör hücresi dizilerine adsorbe edilebilir. Bir kez adsorbe edildikten sonra, nükleik asit- lipit partikülleri, hücrenin bir kısmı, hücre membranları ile lipit değişimi, ya da hücre ile birlikte olabilir. Kompleksin nükleik asit kısmının transfer edilmesi ya da dahil edilmesi bu yollardan herhangi biri ile gerçekleşebilir. Endositoz ile hücreye alınan partiküller söz konusu olduğunda, partiküllerin daha sonra endozomal membran ile etkileşime girdiğine ve bunun sonucunda muhtemelen iki- katmanlı olmayan fazların oluşumuyla sonuçlanan endozomal membranın dengesizleşmesine neden olduğuna, kapsüllenmiş nükleik asitin hücre sitoplazmasına girmesi ile sonuçlandığına inanılmaktadır. Benzer şekilde, partiküllerin hücre plazma membranı ile doğrudan füzyonu durumunda, füzyon gerçekleştiği zaman, lipozom membran, hücre zarına birleştirilir ve lipozomun içeriği hücre içi sıvıyla birleştirilir. Hücre ile lipit- nükleik asit kompozisyonlar arasındaki temas, in vitro olarak gerçekleştirildiğinde biyolojik olarak uyumlu bir ortamda gerçekleşecektir. Kompozisyonların konsantrasyonu, belirli uygulamaya bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir ancak genel olarak yaklaşık 1 µmol ve yaklaşık 10 mmol arasındadır. Bazı uygulamalarda, hücrenin lipit- nükleik asit kompozisyonları ile işleme tabii tutulması genellikle fizyolojik sıcaklıklarda (yaklaşık 37 °C), yaklaşık 1 ila 24 saat arasında, tercih edilen şekliyle yaklaşık 2 ila 8 saat arasında bir zaman periyodu boyunca gerçekleştirilir. İn vitro uygulamalar için, nükleik asitlerin verilmesi, bitki ya da hayvan orijinli, omurgalı ya da omurgasız olsun olmasın kültür içinde büyüyen herhangi bir hücreye ya da herhangi bir dokuya ya da türe olabilir. Tercih edilen uygulamalarda, hücreler, hayvan hücreleri, daha çok tercih edilen şekliyle memeli hücreleri ve en çok tercih edilen şekliyle insan hücreleri olacaktır.

Uygulamaların bir grubunda, bir lipit- nükleik asit partikül süspansiyonu, yaklaşık 10^3 ila yaklaşık 10^5 hücre / mL arasında, daha çok tercih edilen şekliyle yaklaşık 2 x 10^4 hücre / mL hücre yoğunluğuna sahip olan % 60- % 80 konflüent kaplanmış hücrelere ilave edilir. Hücrelere ilave edilen süspansiyonun konsantrasyonu, tercih edilen şekliyle

yaklaşık 0.01 ila 20 µg / mL arasında, daha fazla tercih edilen şekliyle yaklaşık 1 µg / mL olmaktadır.

Tipik uygulamalar, siRNA'nın spesifik hücresel hedefleri susturmak için ya da nakavt olması için hücre içi dağıtımını sağlamak üzere iyi bilinen prosedürlerin kullanılmasını içerir. Alternatif olarak, uygulamalar, terapötik olarak yararlı polipeptidleri kodlayan DNA ya da mRNA sekansların verilmesini içerir. Bu şekilde, terapi, eksik ya da boş gen ürünleri tedarik ederek (yani, Duchenne'nin distrofisi için, bkz. Kunkel ve diğ., Brit. Med. Bull. 45 (3): 630- 643 (1989) sayılı belge), genetik hastalıklar için ve kistik fibroz için sağlanmaktadır, bakınız Goodfellovw, Nature 341: 102- 103 (1989) sayılı belge). Burada tarif edilen kompozisyonlara yönelik diğer kullanımlar, antisens oligonükleotidlerin hücre içine sokulmasını içerir (bakınız, Bennett, ve diğ., Mol. Pharm. 41: 1023- 1033 (1992) sayılı belge).

Alternatif olarak, burada tarif edilen kompozisyonlar, teknikte tecrübeli kişilerce bilinen metotlar kullanılarak, nükleik asitlerin in vivo olarak hücreye aktarılması için de kullanılabilir. DNA ya da mRNA sekanslarının verilmesi ile ilgili olarak, Zhu, ve diğ., Science 261: 209- 211 (1993), DOTMA- DOPE kompleksleri kullanılarak sitomegalovirüs (CMV)- kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) ifadesi plazmidinin intravenöz yoldan uygulanmasını tarif eder. Hyde, ve diğ., Nature 362: 250- 256 (1993), lipozomlar kullanılarak farelerin akciğerinde hava yolu ve alveollerin epiteline sistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) geninin verilmesini tarif eder. Brigham, ve diğ., Am. J. Med. Sci. 298: 278- 281 (1989), farelerdeki akciğerlerin in vivo transfeksiyonunu, hücre içi enzimi kloramfenikol asetiltransferazı (CAT) kodlayan işlevsel bir prokaryotik gen ile tarif eder. Bu nedenle, bunun içinde tarif edilen kompozisyonlar, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılabilir.

Bundan dolayı, bir başka yaklaşımda, burada tarif edilen formülasyonlar, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, PDGF beta geni, Erb- B geni, Src geni, CRK geni, GRB2 geni, RAS geni, MEKK geni, JNK geni, RAF geni, Erk1 / 2 geni, PCNA (p21) geni, MYB geni, JUN geni, FOS geni, BCL- 2 geni, Siklin D geni, EGF geni, EGFR geni, Siklin A geni, Siklin E geni, WNT- I geni, beta- katenin geni, c- MET geni, PKC geni, NFKB geni, STAT3 geni, survivin geni, Her2 / Neu geni, topoizomeraz I geni, topoizomeraz II alfa geni, p73 geni, p21 (WAF1I / CIP1) geni, p27 (KIP1) geni, PPM1D geni, RAS geni, kaveolin I geni, MIB I geni, MTAI geni, M68 geni, tümör baskılayıcı genler, p53 tümör baskılayıcı gen, p53 ailesi üyesi DN- p63, pRb tümör

baskılayıcı geni, APCl tümör baskılayıcı geni, BRCA1 tümör baskılayıcı geni, PTEN tümör baskılayıcı gen, mLL füzyon geni, BCR / ABL füzyon geni, TEL / AML1 füzyon geni, EWS / FLI1 füzyon geni, TLS / FUS1 füzyon geni, PAX3 / FKHR füzyon geni, AML1 / ETO füzyon geni, alfa v- integrin geni, Flt- 1 reseptör geni, tubulin geni, İnsan Papilloma Virüsü geni, İnsan Papilloma Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü geni, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit B Virüsü geni, Hepatit B Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit C Virüsü geni, Hepatit C Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit D Virüsü geni, Hepatit D Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit E Virüsü geni, Hepatit E Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit F Virüsü geni, Hepatit F Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit G Virüsü geni, Hepatit G Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Hepatit H Virüsü geni, Hepatit H Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Respiratuar Sinsitiyal Virüs geni, Respiratuar Sinsitiyal Virüs replikasyonu için gerekli olan bir gen, Herpes Simpleks Virüs geni, Herpes Simpleks Virüs replikasyonu için gerekli bir gen, herpes Sitomegalovirüs geni, herpes Sitomegalovirüs replikasyonu için gerekli bir gen, herpes Epstein Barr Virüsü gen, herpes Epstein Barr virüs replikasyonu için gerekli olan bir gen, Kaposi'nin Sarcoma ile ilişkili Herpes Virus geni, Kaposi'nin Sarcoma ile ilişkili Herpes Virüs replikasyonu için gerekli olan bir gen, JC Virüs geni, JC Virüs replikasyonu için gerekli olan insan geni, miksovirüs gen replikasyonu için gerekli olan bir gen olan miksovirüs geni, rinovirüs geni, rinovirüs replikasyonu için gerekli bir gen, koronavirüs geni, koronavirüs replikasyonu için gerekli bir gen, Batı Nil Virüsü geni, Batı Nil Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, St. Louis Ensefaliti geni, St. Louis Ensefaliti replikasyonu için gerekli olan bir gen, Keneyle geçen ensefalit virüs geni, Keneyle geçen ensefalit virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Murray Valley ensefalit virüsü geni, Murray Valley ensefalit virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, dang virüsü geni, dang virüsü geni replikasyonu için gerekli olan bir gen, Simian Virus 40 geni, Simian Virus 40 replikasyonu için gerekli bir gen, İnsan T Hücresi Lenfotropik Virüs geni, İnsan T Hücresi Lenfotropik Virüs replikasyonu için gerekli bir gen, Moloney- Murin Lösemi Virüsü geni, Moloney- Murin Lösemi Virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, ensefalomiyokardit virüs geni, ensefalomiyokardit virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, kızamık virüs geni, kızamık virüsü replikasyonu için gerekli bir gen, Vericella zoster virüs geni, Vericella zoster virüs replikasyonu için gerekli bir gen, adenovirüs replikasyonu için gerekli bir gen, sarı humma virüsü geni, sarı humma virüsü

replikasyonu için gerekli bir gen, poliovirüs geni, poliovirüs replikasyonu için gerekli bir gen, poksvirüs geni, poksvirüs replikasyonu için gerekli bir gen, Plasmodium geni, Plasmodium için gerekli bir gen, Mikobakteriyum ülserabkar geni, Mikobakteriyum ülseranlarının replikasyonu için gerekli bir gen, Mikobakteriyum tüberküloz geni, Mikobakteriyum tüberküloz replikasyonu için gerekli bir gen, Mikobakteriyum cüzzam geni, Mikobakteriyum cüzzam replikasyonu için gerekli bir gen, Staphylococcus aureus geni, Staphylococcus aureus replikasyonu için gerekli bir gen, Pnömokok geni, Pnömokok replikasyonu için gerekli bir gen, streptokok piyojenler geni, streptokok piyojenlerin replikasyonu için gerekli bir gen, Akciğer iltihaplanması geni, Akciğer iltihaplanmasının replikasyonu için gerekli bir gen, Mikoplazma pnömani geni, Mikoplazma pnömani replikasyonu için gerekli bir gen, bir integrin geni, bir selektin geni, komplement sistem geni, kemokin geni, kemokin reseptör geni, GCSF geni, Grol geni, Gro2 geni, Gro3 geni, PF4 geni, MIG geni, Pro- Trombosit Bazik Protein geni, MIP- II geni, MIP- IJ geni, RANTES geni, MCP- I geni, MCP- 2 geni, MCP- 3 geni, CMBKRI geni, CMB KR2 geni, CMB KR3 geni, CMBKR5v, AIF- I geni, 1- 309 geni, bir iyon kanalının bir bileşenine bir gen, bir nörotransmiter reseptörüne bir gen, bir nörotransmitter ligandı için bir gen, amiloid- aile geni, presenilin geni, HD geni, DRPLA geni, SCA1 geni, SCA2 geni, MJD1 geni, CACNL1A4 geni, SCA7 geni, SCA8 geni, LOH hücrelerinde bulunan allel geni veya bir polimorfik genin bir allel geni içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan bu tip bir hedef geni baskılamak ya da değiştirmek için kullanılabilir.

In vivo olarak uygulama için farmasötik kompozisyonlar tercih edilen şekliyle parenteral olarak, yani, intraartiküler olarak, intravenöz olarak, intraperitonal olarak, subkutan olarak ya da kas içinden tatbik edilir. Belirli uygulamalarda, farmasötik kompozisyonları, bir bolus enjeksiyonu ile intravenöz olarak ya da intra peritoneal olarak tatbik edilir. Bir örnek için bakınız, Stadler, ve diğ., U.S. Patent No. 5,286,634 sayılı belge. Hücresel arası nükleik asit verilmesi de aynı zamanda Straubringer, ve diğ., METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, New York. 101: 512- 527 (1983); Mannino, ve diğ., Biotechniques 6: 682- 690 (1988); Nicolau, ve diğ., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6: 239- 271 (1989), ve Behr, Ace. Chem. Res. 26: 274- 278 (1993) sayılı belgelerde tartışılmaktadır. Halen lipit- bazlı terapötiklerin uygulanmasına ait diğer metotlar, örneğin, Rahman ve diğ., U.S. Patent No. 3,993,754; Sears, U.S. Patent No. 4,145,410; Papahadjopoulos ve diğ., U.S. Patent No. 4,235,871;

Schneider, U.S. Patent No. 4,224,179; Lenk ve diğ., U.S. Patent No. 4,522,803; ve Fountain ve diğ., U.S. Patent No. 4,588,578 sayılı belgelerde tarif edilmiştir.

Diğer metotlarda, farmasötik preparasyonlar, preparasyonun dokuya doğrudan uygulanmasıyla hedef doku ile temas ettirilebilir. Uygulama, topikal, "açık" ya da "kapalı" prosedürler ile yapılabilir. "Topikal" ile, farmasötik preparasyonun, deri, orofarenks, dış işitsel kanal, ve benzeri gibi çevreye maruz kalan bir dokuya doğrudan uygulanması anlamına gelmektedir. "Açık" prosedürler, bir hastanın cildini incitmeyi ve farmasötik preparasyonların uygulandığı altta yatan dokunun doğrudan görselleştirilmesini içeren prosedürlerdir. Bu genellikle, akciğerlere erişmek için torakotomi, abdominal viseraya erişmek için abdominal laparotomi, ya da hedef dokuya diğer doğrudan cerrahi yaklaşım gibi bir cerrahi prosedürle gerçekleştirilir. "Kapalı" prosedürler, iç hedef dokuların doğrudan görselleştirilmediği, ancak derideki küçük yaralar yoluyla aletlerin sokulması yoluyla erişildiği invazif prosedürlerdir, örneğin, preparasyonlar, iğne lavajı ile peritona tatbik edilebilir. Benzer şekilde, farmasötik preparasyonlar, lomber delinmesi sırasında infüzyon yoluyla meninges ya da omuriliğe uygulanarak spinal kordun spinal anestezi ya da metrazamid magingi için yaygın olarak uygulanan hastanın uygun pozisyonu ile uygulanabilir. Alternatif olarak, preparasyonlar endoskopik cihazlarla uygulanabilir.

Lipit- nükleik asit kompozisyonları da aynı zamanda akciğerlere inhale edilen bir aerosol halinde (bakınız, Brigham, ve diğ, Am. J. Sci. 298(4): 278- 281 (1989) sayılı belge) ya da hastalık bölgesine doğrudan enjeksiyon yoluyla (Culver, Human Gen Therapy, Mary Ann Liebert, İne., Publishers, New York, syf.70- 71 (1994) sayılı belge) tatbik edilebilir.

Burada tarif edilen metotlar çeşitli konakçılarda uygulanabilir. Tercih edilen konakçılar, insanlar, insan olmayan primatlar, köpekler, kediler, sığırlar, atlar, koyunlar ve benzerleri gibi memeli türleri içerir.

Burada tarif edilen lipit- terapötik ajan partikülleri için dozajlar, terapötik ajanın lipide oranına ve hastanın yaşına, kilosuna ve durumuna dayanarak doktorun görüşüne bağlı olacaktır.

Bir uygulamada, burada tarif edilen, bir hedef polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyonunun modüle edilmesine ait bir metottur. Bu metotlar genel olarak, bir polinükleotid ya da polipeptidin ifadesinin modüle edebilen bir nükleik asit ile ilişkili olan

burada tarif edilen bir lipit partikülü ile bir hücrenin temas ettirilmesini içerir. Burada kullanıldığı şekliyle, "modüle etme" terimi, bir hedef polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyonunu değiştirmeyi ifade eder. Farklı uygulamalarda, modüle etme, artan ya da zenginleştirici anlamına gelebilir, ya da azalma ya da küçülme anlamına gelebilir. Bir hedef polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyon seviyesinin ölçülmesine yönelik metotlar, teknikte bilinmekte ve temin edilmektedir ve örneğin ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT- PCR) ve immünohistokimyasal teknikleri kullanan metotları içerir. Belirli uygulamalarda, bir hedef polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyon seviyesi, uygun bir kontrol değerine kıyasla en az % 10, % 20, % 30, % 40, % 50, ya da % 50'den daha fazla arttırılır ya da azaltılır.

Örneğin, arzulanan bir polipeptidin ekspresyonun artması durumunda, nükleik asit istenen polipeptidi kodlayan bir polinükleotid içeren bir ekspresyon vektörü olabilir. Diğer taraftan, polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyonunun azaltılması istendiğinde, daha sonra nükleik asit, hedef polipeptidi kodlayan bir polinükleotide spesifik olarak hibritlenen bir polinükleotid sekansını içeren bir antisens oligonükleotid, siRNA, ya da mikroRNA olabilir, böylece hedef polinükleotid ya da polipeptidin ekspresyonunu bozar. Alternatif olarak, nükleik asit, böyle bir antisens oligonükleotid, siRNA ya da mikroRNA'yı eksprese eden bir plazmid olabilir.

Özel bir düzenlemede, burada tarif edilen, bir polipeptit ekspresyonunun bir hücre ile modüle edilmesine dair bir yöntem olup, örneğin, yaklaşık % 20- 65 formül I'in katyonik lipidi, % 3- 25 nötr lipit, % 15- 55 sterol ve % 0.5- 15 PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş PEG molar oranında formül I'in bir katyonik lipit, bir nötr lipit, bir sterol, PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipitten oluşan ya da esas olarak bunlardan oluşan bir lipit partikülünün bir hücreye sağlanmasını içerir, burada lipit partikülü polipeptidin ekspresyonunu modüle edebilen bir nükleik asit ile ilişkilidir. Özel düzenlemelerde, molar lipit oranı yaklaşık olarak 60 / 7.5 / 31 / 1.5, 57.5 / 7.5 / 31 / 3.5, 57.2 / 7.1 / 34.3 / 1.4, 52 / 13 / 30 / 5, 50 / 10 / 38.5 / 1.5, 50 / 10 / 35 / 5, 40 / 10 / 40 / 10, 35 / 15 / 40 / 10 ya da 40 / 15 / 40 / 5'dur (formül I'in katyonik lipidi / DSPC ya da DPPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA'nın mol % 'si). Bazı düzenlemelerde, lipit partikülü ayrıca burada tarif edilen gibi bir hedefleme lipidi (örneğin, lipit partikülü, temel olarak formül I'in bir katyonik lipidi, bir nötr lipit, bir sterol, PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipitten ve bir hedefleme parçasından oluşur) içerir. Düzenlemelerin bir başka grubunda, bu kompozisyonlardaki nötr lipit, DPPC, POPC, DOPE ya da SM

ile yer değiştirir. Düzenlemelerin bir başka grubunda ise PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipit, PEG- DSG, PEG- DMG ya da PEG- DPG ile yer değiştirir.

Belirli uygulamalarda, terapötik ajan, bir siRNA, bir mikroRNA, bir antisens oligonükleotid ve bir siRNA, bir mikroRNA ya da bir antisens oligonükleotidi eksprese edebilen bir plazmid arasından seçilir ve içerisinde siRNA, mikroRNA, ya da antisens RNA, polipeptidin ifadesini azaltacak şekilde polipeptidi kodlayan bir polinükleotide spesifik olarak bağlanan bir polinükleotid içerir.

Diğer uygulamalarda, nükleik asit, burada polipeptid ya da bir fonksiyonel varyant ya da bunların fragmentini kodlayan bir plasmiddir, öyle ki polipeptid ya da bir fonksiyonel varyant ya da bunların fragmentinin ekspresyonu artmaktadır.

İlgili düzenlemelerde, burada tarif edilenler, hücrelerin kültür içinde transfeksiyonu için faydalı reaktiflerdir. Örneğin, burada tarif edilen lipit formülasyonları kültürlenmiş hücrelere (örn., yapışık hücreler, süspansiyon hücreleri, vb.)nükleik asitlerin verilmesi için kullanılabilir.

İlgili uygulamalarda, burada tarif edilen, bir hastadaki bir polipeptidin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilen bir hastalık ya da bozukluğunun tedavi edilmesine yönelik bir metot olup, burada tarif edilen bir farmasötik kompozisyonun hastaya sunulmasını içerir, burada terapötik ajan, bir siRNA, bir mikroRNA, bir antisens oligonükleotid arasından ve bir siRNA, bir mikroRNA ya da bir antisens oligonükleotid eksprese edebilen bir plazmid arasından seçilir ve burada siRNA, mikroRNA, ya da antisens RNA, polipeptidi kodlayan bir polinükleotide ya da bunların bir tamamlayıcısına özellikle bağlanan bir polinükleotidi içerir.

Bir düzenlemede, farmasötik kompozisyon örneğin, yaklaşık % 20- 65 formül I'in katyonik lipidi, % 3- 25 nötr lipit, % 15- 55 sterol ve % 0.5- 15 PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş PEG- DMG, PEG- C- DOMG ya da PEG- cDMA molar oranında formül I'in bir katyonik lipidi, DSPC, Kol ve PEG- DMG, PEG- C- DOMG ya da PEG- cDMA'dan oluşan ya da esas olarak bunlardan oluşan bir lipit partikülü içerir, burada lipit partikülü terapötik nükleik asit ile ilişkilidir. Özel düzenlemelerde, molar lipit oranı yaklaşık olarak 60 / 7.5 / 31 / 1.5, 57.5 / 7.5 / 31 / 3.5, 57.2 / 7.1 / 34.3 / 1.4, 52 / 13 / 30 / 5, 50 / 10 / 38.5 / 1.5, 50 / 10 / 35 / 5, 40 / 10 / 40 / 10, 35 / 15 / 40 / 10 ya da 40 / 15 / 40 / 5'dur (formül I'in katyonik lipidi / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA'nın mol % 'si). Bazı düzenlemelerde, lipit partikülü ayrıca burada tarif edilen gibi

bir hedefleme lipidi (örneğin, lipit partikülü, temel olarak formül I'in bir katyonik lipidi, bir nötr lipit, bir sterol, PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipitten ve bir hedefleme parçasından (örn., Ga1NAc3- PEG- DSG) oluşur) içerir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi bir PEG parçası içerdiğinde ve var olan bir lipozomol formülasyona eklendiğinde, PEG tarafından değiştirilmiş lipidin miktarı, PEG tarafından değiştirilmiş lipidin toplam miktarı (yani, PEG tarafından değiştirilmiş lipit, örneğin PEG- DMG ve PEG içerikli hedefleme lipidi) sabit bir mol yüzdesinde (örn., % 0.3 mol, % 1.5 mol ya da % 3.5 mol) tutulacak şekilde azaltılır. Düzenlemelerin bir başka grubunda, bu kompozisyonlardaki nötr lipit, DPPC, POPC, DOPE ya da SM ile yer değiştirir. Düzenlemelerin bir başka grubunda ise PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipit, PEG- DSG ya da PEG- DPG ile yer değiştirir. İlişkili bir başka düzenlemede, burada tarif edilen, bir denekte bir polipeptidin alt ekspresyonu ile karakterize edilen bir hastalığın ya da rahatsızlığın tedavi edilmesine dair bir yöntem olup, bahsedilen deneğe burada tarif edilen bir farmasötik kompozisyonun sağlanmasını içerir, burada terapötik ajan polipeptidi ya da bunun işlevsel bir varyantını ya da fragmanını kodlayan bir plazmittir.

Burada ayrıca açıklanan, bir denekteki bağışıklık tepkisini tetikleyen bir yöntem olup, bahsedilen deneğe burada tarif edilen bir farmasötik kompozisyonun sağlanmasını içerir, burada terapötik ajan bağışıklığı baskılayan bir oligonükleotittir. Belirli düzenlemelerde, bağışıklık tepkisi hümoral ya da mukozal bir bağışıklık tepkisidir ve örneğin, yaklaşık % 20- 65 formül I'in katyonik lipidi, % 3- 25 nötr lipit, % 15- 55 sterol ve % 0.5- 15 PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş PEG- DMG, PEG- C- DOMG ya da PEG- cDMA'lık bir molar oranında formül I'in bir katyonik lipidi, DSPC, Kol ve PEG- DMG, PEG- C- DOMG ya da PEG- cDMA'dan oluşan ya da esas olarak bunlardan oluşur, burada lipit partikülü terapötik nükleik asit ile ilişkilidir. Özel düzenlemelerde, molar lipit oranı yaklaşık olarak 60 / 7.5 / 31 / 1.5, 57.5 / 7.5 / 31 / 3.5, 57.2 / 7.1 / 34.3 / 1.4, 52 / 13 / 30 / 5, 50 / 10 / 38.5 / 1.5, 50 / 10 / 35 / 5, 40 / 10 / 40 / 10, 35 / 15 / 40 / 10 ya da 40 / 15 / 40 / 5'dur (formül I'in katyonik lipidi / DSPC / Kol / PEG- DMG ya da PEG- cDMA'nın mol % 'si). Bazı düzenlemelerde, lipit partikülü ayrıca burada tarif edilen gibi bir hedefleme lipidi (örneğin, lipit partikülü, temel olarak formül I'in bir katyonik lipidi, bir nötr lipit, bir sterol, PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipitten ve bir hedefleme parçasından oluşur) içerir. Bazı düzenlemelerde, hedefleme lipidi bir PEG parçası içerdiğinde ve var olan bir lipozomol formülasyona

eklendiğinde, PEG tarafından değiştirilmiş lipidin miktarı, PEG tarafından değiştirilmiş lipidin toplam miktarı (yani, PEG tarafından değiştirilmiş lipit, örneğin PEG- DMG ve PEG içerikli hedefleme lipidi) sabit bir mol yüzdesinde (örn., % 0.3 mol, % 1.5 mol ya da % 3.5 mol) tutulacak şekilde azaltılır. Düzenlemelerin bir başka grubunda, bu kompozisyonlardaki nötr lipit, DPPC, POPC, DOPE ya da SM ile yer değiştirir. Düzenlemelerin bir başka grubunda ise PEG ya da PEG tarafından modifiye edilmiş lipit, PEG- DSG ya da PEG- DPG ile yer değiştirir. Başka düzenlemelerde, farmasötik kompozisyon deneğe bir aşı ya da antijen ile birlikte sağlanır. Böylece, burada temin edilenler, burada tarif edilen bir lipit partikülünü içeren aşılar olup, bir bağışıklığı baskılayıcı oligonükleotit içerir ve ayrıca bir bağışıklık tepkisinin arzu edildiği bir antijen ile ilişkilidir. Özel düzenlemelerde, antijen bir tümör antijenidir ya da örn., bir virüs, bakteri ya da parazit gibi bulaşıcı bir ajan ile ilişkilidir.

Çeşitli antijenler, enfeksiyon ajan antijenleri ve diğer hastalıklarla ilişkili antijenler, bu alanda iyi bilinmektedir ve bunların örnekleri burada belirtilen referanslarda açıklanmıştır. Burada kullanım açısından uygun antijenlerin örnekleri, polipeptid antijenleri ve DNA antijenlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Antijenlerin spesifik örnekleri, Hepatit A, Hepatit B, çiçek hastalığı, çocuk felci, şarbon, grip, tifüs, tetanoz, kızamık, rotavirüs, difteri, boğmaca, tüberküloz ve rubella antijenidir. Tercih edilen bir düzenlemede, antijen, bir Hepatit B rekombinant antijenidir. Diğer bakış açılarında, antijen bir Hepatit A rekombinant antijenidir. Diğer bir yaklaşımda, antijen bir tümör antijenidir. Bu tür tümör ile ilişkili antijenlere ait örnekler, MUC- 1, EBV antijen ve Burkitt lenfoma ile ilişikili antijenlerdir. Daha başka bir yaklaşımda, antijen bir tirosinaz ile ilişkili protein tümör antijen rekombinant antijenidir. Teknikte yetkili kişiler, diğer uygun ajanları bilecektir.

Burada kullanım için uygun olan tümör ile ilişkili antijenler, birkaç tümör tipi arasından paylaşılan tekil tümör tipinin indikatifi olabilen ve / veya normal hücreler ile kıyaslandığında tümör hücresi içinde sadece eksprese edilen ya da aşırı eksprese edilen hem mutasyona uğramış hem de mutasyona uğramamış molekülleri içerir. Proteinler ve glikoproteinlere ilave olarak, karbohidratların, gangliosidlerin, glikolipidlerin ve müsinlerin ekspresyonuna özgü spesifik desenler de belgelenmiştir. Denek kanser aşılarında kullanım için örnek teşkil eden tümör ile ilişkili antijenler, onkogenlerin protein ürünlerini, tümör baskılayıcı genleri ve tümör hücresine özgü mutasyonlar ya da yeniden düzenlemelere sahip diğer genleri, yeniden aktive edilmiş

embriyonik gen ürünleri, onkofetal antijenler, dokuya özgü (ancak, spesifik olmayan tümör) farklılaşma antijenleri, büyüme faktörü reseptörleri, hücre yüzeyi karbohidrat kalıntıları, yabancı viral proteinler ve bir dizi diğer kendi kendine ait proteinleri içerir.

Tümör ile ilişkili antijenlere ait spesifik uygulamalar, örneğin, Ras p21 protoonkogenler, tümör baskılayıcı p53 ve BCR- abl onkojenler, bunun yanı sıra CDK4, MUM1, Kaspaz 8, ve Beta katenin'e ait protein ürünleri gibi mutasyona uğramış antijenleri; galektin 4, galektin 9, karbonik anhidraz, Aldolaz A, PRAME, Her2 / neu, ErbB- 2 ve KSA gibi aşırı eksprese edilmiş antijenleri, alfa fetoprotein (AFP), insan korionik gonadotropin (hCG) gibi onkofetal antijenleri; karsinoembriyonik antijen (CEA) gibi kendi antijenleri ve Mart 1 / Melan A, gp100, gp75, Tirosinaz, TRP1 ve TRP2 gibi melanosit farklılaşma antijenleri; PSA, PAP, PSMA, PSM- P1 ve PSM- P2 gibi prostat ile ilişkili antijenler; MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE gibi reaktive edilmiş embriyonik gen ürünleri ve NY- ESO1, SSX2 ve SCP1 gibi diğer kanser testis antijenleri; GM2, GD2 ve GD3 gibi gangliosidleri, Lewis (y) ve globo- H gibi nötr glikolipitler ve glikoproteinleri ve Tn, Thompson- Freidenreich antijen (TF) ve sTn gibi glikoproteinleri içerir. Ayrıca burada tümör ile ilişkili antijenler olarak dahil edilenler, tüm hücre ve tümör hücre lizatlarının yanı sıra bunların immünojenik kısımları, yanı sıra B hücre lenfomalara karşı kullanılması için B lenfositlerin monoklonal proliferasyonu üzerine ifade edilen immünoglobulin idiyotiplerdir.

Patojenler, memelileri ve daha özellikle insanları enfekte eden bulaşıcı ajanları, örneğin virüsleri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Enfekte eden virüse ait örnekler, ancak sınırlandırılmamış olarak: Retroviridae (örneğin, HIV- 1 gibi insan immün yetmezlik virüsleri, (ayrıca HTLV- III, LAV ya da HTLV- III / LAV, ya da HIV- III olarak da anılır) ve HIV- LP gibi diğer izolatlar; Picomaviridae (örneğin, polio virüsleri, hepatit A virüsü; enterovirüsler, insan Coxsackie virüsleri, rinovirüsler, echovirüsler); Caliciviridae (örneğin, gastroenterite neden olan suşlar); Togaviridae (örneğin, ekuin ensefalit virüsleri, kızamıkçık virüsleri); Flaviviridae (örneğin dang virüsleri, ensefalit virüsleri, sarı humma virüsleri); Coronoviridae (örneğin, coronavirüsler); Rhabdoviradae (örneğin, vesiküler stomatitis virüsleri, kuduz virüsleri); Coronaviridae (örneğin, coronavirüsler); Rhabdoviridae (örneğin, vesiküler stomatit virüsleri, kuduz virüsleri); Filoviridae (örneğin, ebola virüsleri); Paramyxoviridae (örneğin, parainfluenza virüsleri, kabakulak virüsü, kızamık virüsü, solunum sinsityal virüsü); Orthomyxoviridae (örneğin, influenza virüsleri); Bungaviridae (örneğin, Hantaan

virüsleri, bunga virüslerin, phlebovirüsler ve Nairo virüslerin; Arena viridae (hemorajik ateş virüsleri); Reoviridae (örneğin, reovirüsler, orbiviurses ve rotavirüsler); Bimaviridae; Hepadnaviridae (Hepatit B virüsü); Parvovirida (parvovirüsler); Papovaviridae (papilloma virüsleri, polioma virüsleri); Adenoviridae (poğu adenovirüs); Herpesviridae herpes simpleks virüsü (HSV) 1 ve 2, varisella zoster virüsü, sitomegalovirüs (CMV), herpes virüsü; Poxviridae (variola virüsleri, vaccinia virüsleri, pox virüsleri); ve Iridoviridae (örneğin, Afrika domuz ateşi virüsü); ve sınıflandırılmamış virüsler (örneğin, Spongiform ensefalopatilerin etiyolojik ajanları, delta hepatitinin ajanı (Hepatit B virüsü detektif bir uydu olduğu düşünüldü), A olmayan, B olmayan hepatitli ajanlar (sınıf 1 = internal olarak iletilen; sınıf 2 = parenteral yolla bulaşan (yani Hepatit C); Norwalk ve ilgili virüsler ve astrovirüsler) içerir.

Ayrıca, gram negatif ve gram pozitif bakteriler omurgalı hayvanlarda antijenler olarak görev yapar. Böyle gram pozitif bakteriler, ancak sınırlandırılmamış olarak, Pasteurella türleri, Staphylococci türleri ve Streptococcus türleri içerir. Gram negatif bakteriler, ancak sınırlandırılmamış olarak, Escherichia coli, Pseudomonas türleri ve Salmonella türleri içerir. Enfekte edici bakterilere ait spesifik örnekler: Helicobacter pyloris, Borelia burgdorferi, Legionella pneumophilia, Mycobacteria sps (örneğin, M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. kansaii, M. gordonae), Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Listeria monocytogens, Streptococcus pyogens (Grup A Streptococcus), Streptococcus agalactiae (Grup B Streptococcus), Streptococcus (viridans Grubu), Streptococcusfaecalis, Streptococcus bovis, Streptococcus (anaerobic sps.), Streptococcus pneumoniae, patojenic Campylobacter sp., Enterococcus sp., Haemophilus infuenzae, Bacillus antracis, corynebacterium diphtheriae, corynebacterium sp., Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringers, Clostridium tetani, Enterobacter aerogens, Klebsiella pneumoniae, Pasturella multocida, Bacteroides sp., Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponema pallidium, Treponema pertenue, Leptospira, Rickettsia, ve Actinomyces israelii içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Patojenlere ait ilave örnekler, memelileri ve daha özellikle insanları enfekte eden enfeksiyöz mantarları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Enfeksiyöz mantarlara ait örnekler: Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis, Candida albicans içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Enfeksiyöz parazitlere ait örnekler, Plasmodium falciparum,

Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, ve Plasmodium vivax gibi Plasmodium içerir. Diğer enfeksiyöz organizmalar (yani, protists), Toxoplasma gondii içerir.

Farmasötik kompozisyonlar

Bir düzenlemede, burada tarif edilenler, burada açıklanan karaciğer izleme modeli ile tanımlanan bir nükleik asit ajanını içeren farmasötik kompozisyonlardır. Kompozisyon, örn., bir dsRNA ve farmasötik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı gibi ajan içerir. Farmasötik kompozisyon, genin ekspresyonuyla ya da aktivitesi ile ilişkili bir hastalığı ya da rahatsızlığı tedavi etmek için faydalıdır. Bu tip farmasötik kompozisyonlar veriliş şekline bağlı olarak formüle edilir. Parenteral dağıtım aracılığı ile sistemik uygulama için formüle edilen formülasyonlar bunun için bir örnektir. Tanımlanmış ajanı içeren farmasötik kompozisyonlar hedef genin örneğin, Faktör VII geninin ekspresyonunu inhibe etmek için yeterli dozajlarda uygulanır. Genelde, dsRNA ajanının uygun bir dozu, alıcının vücut ağırlığındaki kilogram başına günde 0.01 ila 5.0 miligramlık aralıkta, genel olarak ise vücut ağırlığındaki kilogram başına günde 1 mikrogram ila 1 mg'lık aralıkta olacaktır. Farmasötik kompozisyon günde bir kez uygulanabilir ya da dsRNA, gün boyunca uygun aralıklarla iki, üç ya da daha fazla alt dozlar halinde ya da hatta sürekli infüzyon ya da kontrollü bir salım formülasyonu vasıtası ile dağıtım kullanılarak uygulanabilir. Bu durumda, her alt dozda ihtiva edilen dsRNA, toplam günlük dozaja ulaşmak üzere uygun şekilde daha küçük olmalıdır. Dozaj birimi ayrıca, birkaç gün boyunca, örneğin birkaç günlük bir süre boyunca dsRNA'nın sürekli salımını sağlayan geleneksel bir sürekli salım formülasyonu kullanılarak, dağıtılmak üzere birleştirilebilir. Sürekli salım formülasyonları teknikte iyi bilinmektedir ve özellikle buluşun ajanları ile kullanılabilen maddelerin vajinal yoldan verilmesi için yararlıdır. Bu düzenlemede, dozaj birimi uygun bir çoklu günlük doz içerir.

Teknikte uzman bir kişi, hastalığın ya da rahatsızlığın şiddeti, önceki tedaviler, deneğin genel sağlık durumu ve / veya yaşı ve mevcut diğer hastalıkları da içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan bazı faktörlerin bir deneği etkili bir şekilde tedavi etmek için gerekli dozajı ve zamanlamayı etkileyebildiğini takdir edecektir. Ayrıca, bir deneğin terapötik olarak etkili bir miktarda bir bileşimle tedavisi, tek bir tedaviyi veya bir dizi tedaviyi içerebilir. Buluş tarafından kapsanan dsRNA'lar için etkili dozajlar ve in vivo

yarı ömür tahminleri, geleneksel metodolojiler kullanılarak veya burada başka bir yerde tarif edildiği gibi uygun bir hayvan modeli kullanılarak in vivo testler temelinde yapılabilir.

Belirli düzenlemelerde, burada tarif edilen lipit- nükleik asit partikülleri içeren farmasötik kompozisyonlar, standart tekniklere göre hazırlanır ve ayrıca farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı içerir. Genel olarak, normal tuzlu su, farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı olarak tatbik edilecektir. Diğer uygun taşıyıcılar, örneğin, albumin, lipoprotein, globulin, vb. gibi gelişmiş stabilite için glikoproteinler dahil olmak üzere, su, tamponlanmış su, % 0.9 tuzlu su, % 0.3 glisin, ve benzeri içerir. Tuzlu su ya da diğer tuz içerikli taşıyıcıları içeren kompozisyonlarda, taşıyıcı tercih edilen şekliyle lipit partikül oluşumunu takiben ilave edilir. Böylece lipit- nükleik asit kompozisyonları oluşturulduktan sonra, kompozisyonlar normal tuzlu su gibi farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılara seyreltilebilirler.

Elde edilen farmasötik preparasyonlar, konvansiyonel, iyi bilinen sterilizasyon teknikleri ile sterilize edilebilir. Sulu çözeltiler, daha sonra, kullanım için paketlenebilir ya da aseptik koşullar altında filtrelenir ve liyofilize edilir, liyofilize edilmiş preparasyon, uygulamadan önce steril bir sulu çözelti ile birleştirilebilir. Kompozisyonlar, örneğin, sodyum asetat, sodyum laktat, sodyum klorit, potasyum klorit, kalsiyum klorit, vb. gibi, pH ayarlayıcı ve tamponlayıcı ajanları, tonisite ayarlayıcı ajanları ve benzeri gibi yaklaşık fizyolojik koşullar için gereken şekilde farmasötik olarak kabul edilebilir maddeleri içerir. Buna ilaveten, lipidik süspansiyonu, saklanması üzerine serbest radikal ve lipid- peroksidatif hasarlara karşı koruyan lipit koruyucu ajanları içerebilir, a-tokoferol gibi lipofilik serbest radikal söndürücüler ve ferroksamin gibi suda çözünür demir spesifik kenetleyiciler uygundur.

Farmasötik formülasyonlardaki lipit partikülü ya da lipit- nükleik asit partikülünün konsantrasyonu, yani, ağırlıkça yaklaşık % 0.01'den daha az, genellikle yaklaşık % 0,05- % 5 ila % 10 arasında ya da en az ila % 10 ila % 30 arasına kadar geniş bir şekilde değişebilir ve seçilen belirli uygulama tarzına göre sıvı hacimleri, viskoziteleri, vb. tarafından primer olarak seçilecektir. Örneğin, konsantrasyon, tedaviyle ilişkili sıvı yükünü azaltmak için arttırılabilir. Bu, özellikle aterosklerozla ilişkili konjestif kalp yetmezliği ya da ciddi hipertansiyonu olan hastalarda istenebilir. Alternatif olarak, irite edici lipitlerden oluşan kompleksler, uygulama bölgesinde enflamasyonu azaltmak için düşük konsantrasyonlara seyreltilebilir. Uygulamaların bir grubunda, nükleik asit ekli

bir etikete sahip olacak ve tanı için kullanılacaktır (tamamlayıcı nükleik asit varlığını endike edilmesiyle). Bu durumda, uygulanan komplekslerin miktarı, kullanılan belirli etikete, teşhis edilen hastalık durumuna ve klinisyenin kararına bağlı olacaktır ancak genel olarak vücut ağırlığının kilogramı başına (örn., nükleik asit ajanının başına) yaklaşık 0.01 ve yaklaşık 50 mg arasında, tercih edilen şekliyle yaklaşık 0.1 ve yaklaşık 5 mg / kg vücut ağırlığı arasında olacaktır. Bazı düzenlemelerde, uygulanan bir kompleks, vücut ağırlığındaki kilogram başına yaklaşık 0.004 ila yaklaşık 50 mg arasında nükleik asit ajanı içerir (örn., yaklaşık 0.006 mg / kg ila yaklaşık 0.2 mg / kg).

Yukarıda belirtildiği şekliyle, burada tarif edilen lipit- terapötik ajan (örneğin, nükleik asit) partikülleri, polietilen glikol (PEG)- modifiye edilmiş fosfolipidler, PEG- seramid ya da gangliosid G_{M1}- modifiye edilmiş lipitleri ya da agregasyonu önlemek ya da sınırlandırılmak için etkili diğer lipitleri içerir. Bu gibi bileşenlerin ilavesi sadece karmaşık agregasyonu önlemez. Daha ziyade, dolaşım ömrünü arttırmak ve lipid-nükleik asit kompozisyonun hedef dokulara verilmesini arttırmak için bir araç da sağlayabilir.

Aynı zamanda burada tarif edilenler, kit formunda lipid- terapötik ajan kompozisyonlardır. Kit tipik olarak kitin çeşitli elementlerini tutmak için bölümlere ayrılmış bir konteynırdan oluşacaktır. Kit, bunun içinde tarif edilen partiküller ya da farmasötik kompozisyonlar, tercih edilen şekliyle sudan arındırılmış ya da konsantre hale getirilmiş formda içerecektir ve bunların rehidrasyonunu ya da seyreltilmesini ve uygulama talimatlarını içerecektir. Bazı uygulamalarda, partiküller, aktif ajanı içerirken diğer uygulamalarda içermezler.

Karaciğer tarama modeli ile tanımlanan bir ajan ihtiva eden farmasötik kompozisyonlar, lokal veya sistemik tedavinin istenip istenmediğine ve tedavi edilecek alana bağlı olarak bir çok yolla uygulanabilir. Uygulama topikal, pulmoner, mesela nebulizer dahil olmak üzere tozların veya aerosollerin solunması veya havalandırılması ile olabilir; intratrakeal, intranazal, epidermal ve transdermal), oral veya parenteral olabilir. Uygulama ayrıca lokal dağıtım yoluyla belirli dokulara tercih edilen lokalizasyon ile sonuçlanabilecek şekilde örn. eklem içine doğrudan intraartiküler enjeksiyon yoluyla, bağırsak ve bağırsaklara doğrudan uygulama için rektal uygulama ile, serviks ve vajinaya uygulanacak intravajinal uygulama yoluyla, göze verilmesi için intravitreal uygulama yoluyla tasarlanabilir. Parenteral uygulama intravenöz, intraarteriyal,

intraartiküler, subkutan, intraperitonal veya intramüsküler enjeksiyon veya infüzyonu veya intrakranyal, örneğin intratekal veya intraventriküler uygulamayı içerir.

Topikal uygulama için farmasötik kompozisyonlar ve formülasyonlar arasında transdermal yamalar, merhemler, losyonlar, kremler, jeller, damlalar, fitiller, spreyler, sıvılar ve tozlar bulunabilir. Geleneksel farmasötik taşıyıcılar, sulu, toz veya yağlı bazlar, koyulaştırıcılar ve benzerleri gerekli olabilir veya arzu edilebilir. Kaplanmış prezervatifler, eldivenler ve benzerleri de yararlı olabilir. Tercih edilen topikal formülasyonlar, buluşun dsRNA'larının bir lipit, lipozom, yağ asidi, yağ asidi esteri, steroid, kenetleme maddesi veya yüzey aktif madde gibi bir topikal dağıtım bileşeni ile karışım halinde olduğu bileşimleri içerir. Tercih edilen lipidler ve lipozomlar, nötr (örn., Dioleoilfosfatidil etanolamin (DOPE), dimiristoilfosfatidil kolin (DMPC), disearoilfosfatidil kolin) negatif (örn., dimiristoilfosfatidil gliserol veya DMPG) ve katyonik (örn., dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP ve dioleoilfosfatidil etanolamin DOTMA) içerir. Buluşa ait DsRNA'lar lipozomlar içinde kapsüllenebilir veya özellikle katyonik lipozomlar kompleksler oluşturabilir. Tercih edilen yağ asitleri ve esterleri arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte araşidonik asit, oleik asit, ekosanoik asit, laurik asit, kaprilik asit, kaprik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, linolenik asit, dikaprat, trikaprat, monoolin, dilaurini gliseril 1- monokaprat, 1-dodesilizasikloheptan- 2- on, bir asilkarnitin, bir asilkolin veya bir C_{1-10} alkil ester (ör., izopropil miristat IPM), monogliserit, digliserit veya farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu yer alır. Topikal formülasyonlar, 20 Mayıs 1999'da dosyalanmış ABD patent başvurusu Ser. No. 09 / 315,298 sayılı ABD Patentinde tarif edilmektedir.

Oral uygulama için bileşimler ve formülasyonlar, tozlar veya granüller, mikropartikülatlar, nanopartikülatlar, süspansiyonlar veya su veya sulu olmayan ortamlardaki çözeltiler, kapsüller, jel kapsüller, paketler, tabletler veya mini tabletler içerir. Yoğunlaştırıcılar, lezzet verici maddeler, seyrelticiler, emülsifiye ediciler, dağıtıcı yardımcı maddeler veya bağlayıcılar istenebilir. Tercih edilen oral formülasyonlar, buluşun dsRNA'lannın bir veya daha fazla penetrasyon arttırıcı sürfaktan ve şelatlayıcı ile birlikte uygulandığı formülasyonlardır. Tercih edilen yüzey aktif maddeler arasında yağ asitleri ve / veya esterleri veya bunların tuzları, safra asitleri ve / veya bunların tuzları bulunur. Tercih edilen safra asitleri / tuzları arasında, kenodeoksikolik asit (CDCA) ve üredeoksikondeoksikolik asit (UDCA), kolik asit, dehidrokolik asit, deoksikolik asit, glukolik asit, glikolik asit, glikodeoksikolik asit, taurokolik asit,

taurodeoksikolik asit, sodyum tauro- 24, 25- dihidro- fusidat ve sodyum glikadhidrofutidat bulunur. Tercih edilen yağ asitleri arasında araşidonik asit, undekanoik asit, oleik asit, laurik asit, kaprilik asit, kaprik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, linolenik asit, dikaprat, trikaprat, monoolein, dilaurin, gliseril 1-monokaprat, l- dodesilizasikloheptan- 2- on, bir asilkarnitin, bir asilkolin veya bir monogliserit, bir digliserit veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu (örn. sodyum) yer alır. Ayrıca tercih edilenler, penetrasyon arttırıcıların, örneğin safra asitleri / tuzları ile kombinasyon halinde yağ asitleri / tuzlarının kombinasyonlarıdır. Özellikle tercih edilen bir kombinasyon, laurik asit, kaprik asit ve UDCA'nın sodyum tuzudur. Daha fazla penetrasyon arttırıcılar arasında polioksietilen- 9- lauril eter, polioksietilen- 20- setil eter bulunur. Buluşa ait DsRNA'lar, püskürtülerek kurutulmuş parçacıklar dahil olmak üzere granüler formda oral yoldan veya mikro veya nanopartiküller oluşturmak üzere kompleks haline getirilebilir. DsRNA kompleks oluşturucu maddeler arasında poli- amino asitler; poliiminler; poliakrilatlar; polialkil akrilatlar, poliokstanlar, poli alkilsianoakrilatlar; katyonize jelatinler, albüminler, nişastalar, akrilatlar, polietilenglikoller (PEG) ve nişastalar; poli alkilik anoakrilatlar; DEAE türevli poliminler, pollulanlar, selülozlar ve nişastalar bulunur. Özellikle tercih edilen kompleksleştirici ajanlar kitosan, N- trimetilkitosan, poli- L- lisin, polihistidin, poliornitin, poli sperminler, protamin, polivinilpiridin, politiyo- dietilaminometiletilen P (TDAE), poliaminostiren (örn., P- amino), poli (metil siyanoakrilat), poli (etil siyanoakrilat), poli (bütilsiyanoakrilat), poli (izobutilsiyanoakrilat), poli (izohekzilsiyanoakrilat), DEAE-metakrilat, DEAE- heksilakrilat, DEAE- akrilamid, DEAE- albümin ve DEAE- dekstran, polimetakrilat, poliheksilakrilat, poli (D, L- laktik asit)), poli (DL- laktik- ko- glikolik asit (PLGA), aljinat ve polietilenglikol (PEG) içerir. DsRNA'lar için oral formülasyonlar ve bunların hazırlanması ABD başvurusu seri no. 08 / 886,829'da (1 Temmuz 1997'da başvurulmuş), Seri No. 09 / 108,673 (1 Temmuz 1998'de başvurulmuş), Seri No. 09 / 256,515 (23 Şubat 1999'da başvurulmuş), Seri No. 09 / 082,624 (21 Mayıs 1998'de başvurulmuş) ve Seri No. 09 / 315,298'de (20 Mayıs 1999'da başvurulmuş) ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

Parenteral, intratekal veya intraventriküler uygulama için bileşimler ve formülasyonlar, ayrıca, sınırlı olmamakla birlikte penetrasyon arttırıcılar, taşıyıcı bileşikler ve diğer farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar veya eksipiyanlar gibi tamponlar,

seyrelticiler ve diğer uygun katkı maddeleri de ihtiva edebilen steril sulu çözeltileri içerebilir.

Farmasötik bileşimler arasında, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte çözeltiler, emülsiyonlar ve lipozom içeren formülasyonlar bulunur. Bu bileşimler, önceden oluşturulmuş sıvılar, kendiliğinden emülsifiye edici katılar ve kendi kendine emülsifiye yarı katıları içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli bileşenlerden üretilebilir.

Uygun olarak birim dozaj formunda sunulabilecek farmasötik formülasyonlar, farmasötik endüstrisinde iyi bilinen geleneksel tekniklere göre hazırlanabilir. Bu teknikler, aktif bileşenlerin farmasötik taşıyıcı (lar) veya yardımcı madde (ler) ile bir araya getirilmesi adımını içerir. Genel olarak, formülasyonlar, aktif bileşenlerin sıvı taşıyıcılar veya ince bölünmüş katı taşıyıcılar veya her ikisi ile muntazam bir şekilde ve bir araya getirilmesiyle ve daha sonra gerekirse ürünün şekillendirilmesiyle hazırlanır.

Bileşimler, tabletler, kapsüller, jel kapsülleri, sıvı şuruplar, yumuşak jeller, supozituvarlar ve lavmanlar gibi, ancak bunlarla sınırlı olmayan birçok olası dozaj formundan herhangi birine formüle edilebilir. Buluşun bileşimleri ayrıca sulu, susuz veya karışık ortamlarda süspansiyon halinde formüle edilebilir. Sulu süspansiyonlar ayrıca, örneğin sodyum karboksimetilselüloz, sorbitol ve / veya dekstran dahil olmak üzere süspansiyonun viskozitesini artıran maddeler içerebilir. Süspansiyon ayrıca stabilizörler de içerebilir.

Bir düzenlemede farmasötik bileşimler, köpükler halinde formüle edilebilir ve kullanılabilir. Farmasötik köpükler, bunlarla sınırlı olmamak üzere, emülsiyonlar, mikroemülsiyonlar, kremler, jöleler ve lipozomlar gibi formülasyonları içerir. Temel olarak temelde benzer olsa da, bu formülasyonlar bileşenlerde ve nihai ürünün kıvamında değişiklik gösterir. Bu gibi bileşimlerin ve formülasyonların hazırlanması genel olarak farmasötik ve formülasyon teknolojilerinde uzman kişilerce bilinir ve burada tarif edilen bileşimlerin formülasyonuna uygulanabilir.

Burada kullanılan ifadeler ve terminoloji, açıklama amaçlıdır ve sınırlayıcı olarak kabul edilmemelidir. Burada "dahil", "içeren", "sahip olan", "ihtiva eden", "bulunduran" ve bunların varyasyonlarının kullanımı, bundan sonra listelenen maddeleri ve bunların eşdeğerlerini ve ayrıca ek maddeleri kapsamaktadır.

ÖRNEKLER

Aşağıdaki örnekler talep edilen buluşu açıklamayı, ancak sınırlamamayı önermektedir.

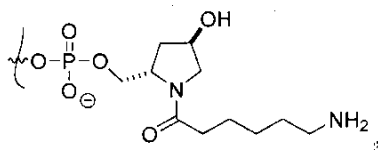
Burada sağlanan Örneklerde kullanıldığı üzere, "ApoE" terimi, aksi belirtilmediği sürece ApoE3'ü ifade eder.

Örnek 1: Luc ve FVII hedefleme için siRNA dupleksleri

Aşağıdaki Tablo 8 Luc ve FVII'nin hedeflenmesi için örnek niteliğinde sekanslar sağlamaktadır.

Tablo 8

Dupleks	Sens / Antisens	Sekans 5'- 3'	Hedef
	1000 / 2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCAGCG fUAA GdT*dT	Luc
	2433 / 1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
	2433 / 2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCAGCG fUAA GdT*dT	Luc
	1000 / 1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCAGCG UAA GdTdT	Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT	FVII

Not: L8 ifadesi, dir, küçük harf 2'- O- metil ile modifiye edilmiş nükleotittir, * osforotioat omurga bağlarıdır, fN ifadesi bir 2'- floro nükleotittir, dN ifadesi 2'- deoksi nükleotittir.

Örnek 2: Katyonik lipit türevi lipozomlar kullanılarak FVII'nin in vivo değerlendirilmesi

***In vivo* kemirgen Faktör VII ve *ApoB* susturma deneyleri.**

C57BL / 6 farelerine (Charles River Labs, MA) ve Sprague- Davvley sıçanlarına (Charles River Labs, MA), 0.01 mL / g'lık bir hacimde kuyruk ven enjeksiyonu aracılığıyla arzu edilen formülasyonda ya salin (tuzlu su) ya da siRNA verilmiştir. Uygulama sonrası çeşitli zaman noktalarında, hayvanlara izofloran inhalasyonu ile anestezi uygulanmış ve kan, retro orbital kanamayla serum ayırıcı tüpleri içerisine toplanmıştır. Faktör VII proteinin serum seviyeleri, üretici protokollerine göre bir kromojenik analizi (Coaset Faktör VII, DiaPharma Grubu, OH ya da Biofen FVII, Aniara Corporation, OH) kullanılarak numunelerde belirlenmiştir. Salin ile işleme tabii tutulmuş olan hayvanlardan toplanan serum kullanılarak standart bir eğri oluşturulur. Karaciğer mRNA seviyelerinin değerlendirildiği deneylerde, uygulama sonrası çeşitli zaman noktalarında, hayvanlar kurban edilmiştir ve karaciğerler toplanmış ve sıvı nitrojen içinde dondurulmuş halde tutulmuştur. Dondurulmuş karaciğer dokusu toz haline getirilir. Doku lizatları hazırlanır ve Faktör VII ve apoB'nin karaciğer mRNA seviyeleri dallanmış DNA analizi (Ouantijen Assay, Panomics, CA) kullanılarak belirlenir.

Örnek 3. FVII hedefleme için Lipozom Formülasyonları

Faktör VII (FVII), pıhtılaşma kaskadındaki öne çıkan bir protein karaciğerde (hepatositlerde) sentezlenir ve plazmaya salgılanır. Plazmadaki FVII seviyeleri basit, plaka tabanlı kolorimetrik bir analiz ile belirlenebilir. Bu şekilde, FVII, hepatosit türevi proteinlerin sirna aracılı aşağı düzenlemesinin belirlenmesinin yanı sıra plazma konsantrasyonlarının ve nükleik asit lipit partiküllerinin ve siRNA doku dağılımının izlenmesi için uygun bir model sunar.

Farelerde Faktör VII Nakavtı

FVII aktivitesi, C57BL / 6 farelerinde intravenöz (bolus) enjeksiyondan 24 saat sonra FVII siRNA ile muamele edilmiş hayvanlarda değerlendirilmiştir. FVII, serum ya da dokudaki protein seviyelerini belirlemeye yönelik ticari olarak temin edilebilen bir kit kullanılarak, bir mikro plaka ölçeğinde üreticinin talimatları takip edilerek ölçülmüştür. FVII azalması, tedavi edilmemiş kontrol farelerine karşı belirlenmiştir ve sonuçlar Kalıntı FVII % 'si olarak ifade edilmiştir. Dört doz seviyesi (2, 5, 12.5, 25 mg / kg FVII siRNA) her yeni lipozom kompozisyonun başlangıç ekranında kullanılmıştır ve bu dozlama, başlangıçtaki ekranda elde edilen sonuçlara dayanarak sonraki çalışmalarda genişletilmiştir.

Tolere edilebilirliğin belirlenmesi

Her yeni lipozomal siRNA formülasyonunun tolere edilebilirliği, ağırlık değişiminin, kafes yanı gözlemleri, klinik kimya ve bazı durumlarda, hematolojinin izlenmesi ile değerlendirildi. Hayvan ağırlıkları tedaviden önce ve tedaviden 24 saat sonra kaydedildi. Veriler, Vücut Ağırlığındaki % 'ce Değişim olarak kaydedildi. Vücut ağırlığı ölçümlerine ek olarak, enjeksiyondan 24 saat sonra her doz seviyesinde (2, 5, 12.5 ve 25 mg / kg siRNA) karaciğer fonksiyonu markörleri de dahil olacak şekilde bir tam klinik kimya paneli FVII analizi için toplanan serumun bir bölütü kullanılarak elde edildi. Numuneler analiz için Hayvanlar için Merkezi Laboratuar'a (Langley, BC) gönderildi. Bazı durumlarda, hematoloji analizi için tüm kanın toplanmasına olanak sağlamak üzere tedavi grubuna ek fareler dahil edildi.

Terapötik İndeksin Belirlenmesi

Terapötik indeks (TI), toksisite ve aktivite ölçümlerinin karşılaştırılması ile üretilen keyfi bir parametredir. Bu çalışmalar için TI aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

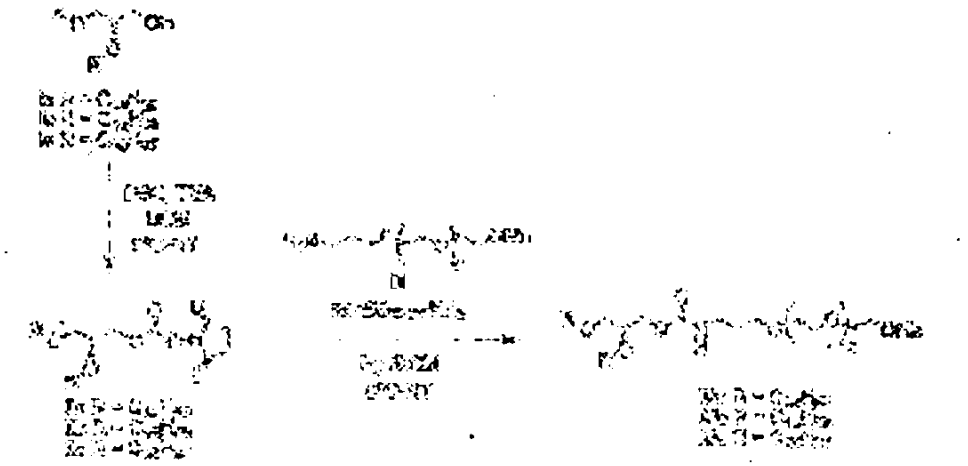
TI = MTD (maksimum tolere edilen doz) / ED_{50} (% 50 FVII nakavt için doz)

Bu çalışmalara yönelik MTD, kemirgenlerde vücut ağırlığında % 7'den büyük azalmaya, alanin aminotransferazda (ALT) a>200 kat artışa, karaciğer hasarı için iyi spesifiteye sahip bir klinik kimyasal marköre yol açan en düşük doz olarak ayarlandı. ED_{50}, FVII doz aktivitesi eğrilerinden belirlendi.

Örnek 1'de sağlanan gibi AD 1661 siTNA, DLin- M- C3- DMA: DSPC: Kol: PEG-DMG'nin aşağıdaki molar oranını da içeren formülasyonlarda uygulanmış olup, bunlar Örnek 2'de tarif edilen yöntemlerde hazırlanmış ve test edilmiştir: 60: 7.5: 31: 1.5; 50:

10: 38: 0.5: 1.5 ve 40: 20: 38.5: 1.5. Bu in vivo deneylerin sonuçları Şekil 1'de temin edilmekte, test edildiği üzere formülasyonların susturma kabiliyetini göstermektedir.

Örnek 4. 1,2- Di- O- alkil- sn3- Karbomoilgliserit'in (PEG- DMG) hazırlanması



IVa'nın Hazırlanması

1,2- Di- O- tetradesil- sn- gliserid **Ia** (30 g, 61.80 mmol) ve N,N'- süksinimidilkarbonat (DSC, 23.76 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (DCM, 500 mL) içine alınır ve bir buzlu su karışımı üzerine karıştırıldı. Trietilamin (TEA, 25.30 mL, 3 eşdeğ.), karıştırma çözeltisine ilave edildi ve sonradan reaksiyon karışımın, ortam sıcaklığında bütün gece boyunca karıştırılmasına izin verildi. Reaksiyonun ilerleyişi TLC ile izlenir. Reaksiyon karışımı DCM (400 mL) ile seyreltilir ve organik katman, su (2 X 500 mL), sulu $NaHCO_3$ çözeltisi (500 mL) akabinde standart düzen ile yıkandı. Elde edilen kalıntı bütün gece boyunca yüksek vakum altında ortam sıcaklığında kurutuldu. Kurutmanın ardından, böylece elde edilen ham karbonat **IIa**, diklorometan (500 mL) içinde çözündü ve bir buzlu banyo üzerinde karıştırıldı. Karıştırılma çözeltisine, $mPEG_{2000}$- NH_2 (**III**, 103.00 g, 47.20 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve susuz piridin (Py, 80 mL, fazlalık) argon altında ilave edildi. Reaksiyon karışımının daha sonra bütün gece boyunca ortam sıcaklığında karıştırılmasına izin verildi. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartıldı ve kalıntı DCM (200 mL) içinde çözünür ve etil asetat içinde silika jelin bir kolonu üzerine yüklendi. Kolon başlangıç olarak etil asetat ile ve sonradan beyaz bir katı olarak (105.30 g, % 83) istenen PEG- Lipit **IVa**'yı vermek üzere diklorometan içinde % 5- % 10 metanol'ün gradyanı ile ayrıldı. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.20- 5.12 (m, 1 H), 4.18- 4.01 (m, 2 H), 3.80- 3.70 (m, 2 H), 3.70- 3.20 (m,-

0- CH_2- CH_2- O- , PEG- CH_2), 2.10- 2.01 (m, 2 H), 1.70- 1.60 (m, 2 H), 1.56- 1.45 (m, 4H), 1.31- 1.15 (m, 48H), 0.84 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2660- 2836.

IVb'nin Hazırlanması

1.2- Di- O- hekzadesil- sn- gliserid **Ib** (1.00 g, 1.848 mmol) ve DSC (0.710 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (20 mL) içinde birlikte alındı ve bir buzlu su karışımı içinde 0 °C'ye soğutuldu. Trietilamin (1.00 mL, 3 eşdeğ.) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi, DCM ile seyreltildi, su (2 kere), $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı ve sodyum sülfat üzerine kurutuldu. Çözücüler azalan basınç altında ayrıştırıldı ve **IIb'nin** elde edilen kalıntısı, bütün gece boyunca yüksek vakum altında muhafaza edildi. Bu bileşik, ayrıca saflaştırılmaksızın bir sonraki reaksiyon için doğrudan kullanılmıştır. $MPEG_{2000}$- NH_2 **III** (1.50 g, 0.687 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve **IIb** (0.702g, 1.5 eşdeğ.), argon altında diklorometan (20 mL) içinde çözündü. Reaksiyon 0 °C'ye soğutuldu. Piridin (1 mL, fazlalık) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartıldı ve kalıntı, beyaz bir katı olarak (1.46 g, % 76) arzu edilen bileşik **IVb** elde etmek üzere kromatografi ile (ilk etil asetat akabinde bir gradyan elüsyon olarak % 5- % 10 MeOH / DCM ile) saflaştırıldı. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.17 (t, J = 5.5 Hz, 1 H), 4.13 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 4.05 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 3.82- 3.75 (m, 2 H), 3.70- 3.20 (m,- O- CH_2- CH_2- O- , PEG- CH_2), 2.05- 1.90 (m, 2 H), 1.80- 1.70 (m, 2 H), 1.61- 1.45 (m, 6H), 1.35- 1.17 (m, 56H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2716- 2892.

IVc'nin Hazırlanması

1.2- Di- O- oktadesil- sn- gliserid **Ic** (4.00 g, 6.70 mmol) ve DSC (2.58 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (60 mL) içinde birlikte alınır ve bir buzlu su karışımı içinde 0 °C'ye soğutuldu. Trietilamin (2.75 mL, 3 eşdeğ.) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi, DCM ile seyreltildi, su (2 kere), $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı ve sodyum sülfat üzerine kurutuldu. Çözücüler azalan basınç altında ayrıştırıldı ve kalıntı, bütün gece boyunca yüksek vakum altında muhafaza edildi. Bu bileşik, ayrıca saflaştırılmaksızın bir sonraki reaksiyon için doğrudan kullanılmıştır. $MPEG_{2000}$- NH_2 **III** (1.50 g, 0.687 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve **IIc** (0.760g, 1.5 eşdeğ.), argon altında diklorometan ((20 mL) içinde çözündü. Reaksiyon 0 °C'ye soğutuldu. Piridin (1 mL, fazlalık) ilave edildi ve reaksiyon bütün

gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartıldı ve kalıntı, beyaz bir katı olarak (0.92 g, % 48) arzu edilen bileşik **IVc'yi** elde etmek üzere kromatografi ile (etil asetat akabinde bir gradyan elüsyon olarak % 5- % 10 MeOH / DCM ile) saflaştırıldı. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.22- 5.15 (m, 1 H), 4.16 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 4.06 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 3.81- 3.75 (m, 2 H), 3.70- 3.20 (m,- O- CH2- CH2- O- , PEG- CH2), 1.80- 1.70 (m, 2 H), 1.60- 1.48 (m, 4H), 1.31- 1.15 (m, 64H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2774- 2948.

Örnek 5. DLin- M- C3- DMA'nın (yani, (6Z,9Z,28Z,31Z)- heptatriakonta- 6,9,28,31- tetraen- 19- il- 4- (dimetilamino) bütanoat) hazırlanması

Diklormetan (5 mL) içindeki (6Z,9Z,28Z,31Z)- heptatriakonta- 6,9,28,31- tetraen- 19- ol (0.53 g), 4,N,N- dimetilaminobütirik asit hidroklorür (0.51 g), 4- N,N- hidroklorür'ün (0.53 g) bir solüsyonu oda sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Solüsyon, seyreltik hidrolik asit ile bunu takibe seyreltik sulu sodyum bikarbonat ile yıkandı. Organik fraksiyonlar susuz magnezyum sülfat üzerinde kurutuldu, filtrelendi ve bir rotovap (döner buharlaştırıcı) üzerinde çözücü uzaklaştırıldı. Kalıntı, % 1- 5'lik bir metanol / diklormetan elüsyon gradyeni kullanılarak bir silika jel kolonuna (20 g) aktarıldı. Saflaştırılmış ürünü içeren fraksiyonlar birleştirildi ve çözücü, renksiz bir yağ (0.54 g) verecek şekilde uzaklaştırıldı.

Burada tarif edilen bileşikler aşağıdaki makalelerde tarif edilen prosedürler ile sentezlenebilir:

1. Schlueter, Urs; Lu, Jun; Fraser- Reid, Bert. **Synthetic Approaches To Heavily Lipidated Phosphoglyceroinositides.** Organic Letters (2003), 5(3), 255- 257.

2. King, J. F.; Allbutt, A. D. Can. J. Chem. 1970, 48, 1754- 1769

3. Mach, Mateusz; Schlueter, Urs; Mathew, Felix; Fraser- Reid, Bert; Hazen, Kevin C. **Comparing n- pentenyl orthoesters and n- pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors**. Tetrahedron (2002), 58(36), 7345- 7354.

Örnek 6. Çeşitli lipozomal kompozisyonlara sahip MC3 lipozomlarının sıçanlarda etkinliği

MC3 içeren lipozomal formülasyonların doz tepkisini incelemek için aşağıdaki lipozomal formüller temel olarak Örnek 2'de açıklandığını gibi hazırlanır. Aşağıdaki

tabloda sunulduğu gibi ihtiva edilen bileşenler şu şekilde gösterilir: MC3- DSPC- Kolesterol- PEG- C14. Tablo 9, test edildiği üzere örnek niteliğinde formülasyonlar sağlar.

Hayvanlar Sprague- Dawley

Toplam 27

Enjeksiyon Vol. (uL) 5 ul / g enjeksiyon

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	3				5		PBS
2	3	FVII	1661	0.06	5	0.30	50- 10- 38.5- 1.5
3	3	FVII	1661	0.02	5	0.10	50- 10- 38.5- 1.5
4	3	FVII	1661	0.006	5	0.03	50- 10- 38.5- 1.5
5	3	FVII	1661	0.002	5	0.01	50- 10- 38.5- 1.5
6	3	FVII	1661	0.06	5	0.30	40- 15- 40- 5
7	3	FVII	1661	0.02	5	0.10	40- 15- 40- 5
8	3	FVII	1661	0.006	5	0.03	40- 15- 40- 5
9	3	FVII	1661	0.002	5	0.01	40- 15- 40- 5

Şekil 2'de gösterildiği gibi % 50 mol MC3'e sahip olan lipozomal formülasyon, % 40 mol MC3'e sahip olan lipozomal formülasyonunkinden nispeten daha düşük siRNA konsantrasyonlarında etkili bir dozaj tepkisi eğrisi göstermiştir.

Örnek 7. MC3 lipozomlarının etkinliği farelerde ApoE bağımlılığı gösterir.

Çeşitli lipozom formülasyonlarının etkinliği açısından ApoE'nin rolünü daha fazla incelemek için, vahşi tip ve ApoE nakavt farelerine, esas olarak Örnek 2'de tarif edildiği

gibi, 0.1- 0.03 ve 0.01 mg / kg'da AD- 1661 siRNA bileşimini içeren MC3 lipozomları uygulanmıştır. Lipozom formülasyonlarının yarısı, ekzojen ApoE ilavesinin farelerde proteinin yokluğunun üstesinden gelip gelemeyeceğini belirlemek için rekombinant ApoE proteini ile önceden karıştırılmıştır.

Tablo 10 aşağıda, test edilen gibi örnek niteliğindeki formülasyonları göstermektedir.

Tablo 10

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL / 6 ve ApoE nakavt

Toplam 42

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Fare Tipi	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Doz (mg / kg)	Araç
1	3	C57BL / 6	FVII			0.00	PBS
2	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0100	0.100	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
3	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0030	0.030	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
4	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0010	0.010	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
5	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0100	0.100	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5
6	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0030	0.030	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5

7	3	C57BL / 6	FVII	1661	0.0010	0.010	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5
8	3	ApoE nakavt		1661		0.00	PBS
9	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0100	0.100	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
10	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0030	0.030	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
11	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0010	0.010	MC350- 10- 38.5- 1.5 w / ApoE
12	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0100	0.100	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5
13	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0030	0.030	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5
14	3	ApoE nakavt	FVII	1661	0.0010	0.010	50- 10- MC350- 10- 38.5- 1.5 w / o ApoE.5- 1.5

Şekil 3, MC3 ile formüle edilmiş lipozomlar ile birlikte uygulandığında, vahşi tipteki (sağ çubuklar) FVII protein seviyelerinin doza bağlı zayıflamasını gösterirken, ApoE eksikliği olan nakavt farelerinde (sol çubuklar) göstermez, hücresel alımda ve / veya karaciğere verilmesinde ApoE'nin rolünü düşündürmektedir. Yukarıda 1661 siRNA ile tarif edildiği gibi formüle edilen MC3 lipozomları, kendi başına 0.1, 0.03 ve 0.01 mg / kg konsantrasyonlarda uygulandı veya ApoE lipoprotein ile önceden karıştırıldı. Bununla birlikte, çok daha yüksek dozlarda (örneğin, ~1.0 mg / kg veya üzeri), MC3 ile formüle

edilmiş formülasyonların, FVII mRNA ve proteinin susturulmasına aracılık ettiği bulunmuştur (gösterilmemiştir). Şekil 3'te gösterildiği gibi Test edilen MC3 formüllü lipozomal formülasyonlar, rekombinant ApoE ile önceden karıştırılmadıkça, ApoE nakavt farelerinde FVII'nin susturulmasına aracılık edememektedir. Böylece, ApoE nakavt farelerinde aktivite, MC3'ün (bir MC3 içeren lipozom) ApoE ile karıştırılmasıyla kurtarılabilir.

Örnek 8: Fosfokolinlerin mol yüzdesi ve kuyruk uzunluğu açısından değişen lipozomal formülasyonlar içeren MC3'ün etkisi

Çeşitli lipozom formülasyonlarının etkinliğine fosfolkolinlerin mol yüzdesi ve kuyruk uzunluğundaki varyasyonların etkisini incelemek için, DSPC, DMPC ve DLPC içeren çeşitli formülasyonlar FVII susturmanın etkisi açısından 0.01 ya da 0.03 mg / kg'da test edildi.

Tablo 11 aşağıda, test edilen gibi örnek niteliğindeki formülasyonları göstermektedir:

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL / 6

Toplam 45

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Doz (mg / kg)	Araç
1	3	FVII			0.00	PBS
2	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DSPC
3	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DSPC
4	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DMPC

5	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DMPC
6	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DLPC
7	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 50- 10- 38.5- 1.5 1661 DLPC
8	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DSPC
9	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DSPC
10	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DMPC
11	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DMPC
12	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DLPC
13	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 40- 20- 38.5- 1.5 1661 DLPC
14	3	FVII	1661	0.0010	0.010	MC3 30- 30- 38.5- 1.5 1661 DMPC
15	3	FVII	1661	0.0003	0.003	MC3 30- 30- 38.5- 1.5 1661 DMPC

Şekil 4, MC3'ün mol yüzdesindeki değişikliklerin etkilerini, ör., yüzde 50 ve 40 molü karşılaştırarak ve formülasyonu içeren DMPC, 50, 40 ve 30 mol yüzdesi için olan etkiyi göstermektedir.

Örnek 9: Ga1NAc lipitlerinin lipozom formülasyonlarına dahil edilmesi

Potansiyel alternatif dağıtım mekanizmalarını araştırmak için in vivo deneyler, N- asetil galaktosamin (Ga1NAc) konjuge lipidleri içeren lipozom formülasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ga1NAc reseptörünün karaciğerde yüksek oranda eksprese edildiği sanıldığı için Ga1NAc olası bir hedefleme ligandı olarak seçilmiştir. Bu nedenle, farelerde ve sıçanlarda, Örnek 2'de tarif edildiği gibi, Formül III'ün Ga1NAc- PEG- DSG lipidini içeren MC3 içeren lipozomal formülasyonların etkinliğini test etmek için çalışmalar yapılmıştır. Tüm deneylerde, toplam PEG- konjuge lipit miktarı sabit tutuldu (örneğin,% 0.5 mol GalNAc3- PEG ilave edildiğinde, karşılık gelen PEG- DSG miktarı% 0.5 mol azaldı). Deneyde genotip başına dokuz grubun her biri için dört hayvan kullanılmıştır.

Aşağıdaki Tablo 12, formülasyonların C57BL6 farelerinde test edildiği,% 5 PEG lipit konsantrasyonuna sahip olan MC3 içeren lipozomları içeren yöntemler için deneysel ayrıntı sağlamaktadır. Aşağıdaki nispi molar miktarları içeren lipozomlar: MC3 / DSPC / Chol / PEG- DSG'nin 50 / 10 / 35 / 5. Burada, % 0.5 GalNAc3- PEG eklendiğinde, karşılık gelen PEG- DSG miktarı% 4.5'e düşürülür.

Tablo 12

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL / 6

Toplam 45

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0.1	10	1.00	50 / 10 / 35 / 5
3	4	FVII	1661	0.05	10	0.50	50 / 10 / 35 / 5
4	4	FVII	1661	0.025	10	0.25	50 / 10 / 35 / 5

5	4	FVII	1661	0.0125	10	0.125	50 / 10 / 35 / 5
6	4	FVII	1661	0.1	10	1.00	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
7	4	FVII	1661	0.05	10	0.50	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
8	4	FVII	1661	0.025	10	0.25	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
9	4	FVII	1661	0.0125	10	0.125	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi

Aşağıda Tablo 13, % 10 mol PEG- DSG lipidi konsantrasyonuna sahip lipozomlar içeren MC3 ihtiva eden yöntemler için deneysel detay sağlar, burada formülasyonlar C57BL6 farelerinde test edildi. Lipozomlar aşağıdaki molar miktarları içerdi: 50 / 10 / 30 / 10 MC3 / DSPC / Kol / PEG- DSG. Burada % 0.5 Ga1NAc3- PEG ilave edildi, PEG- DSG'nin karşılık gelen miktarı % 9.5 azaltıldı.

Tablo 13

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL6

Toplam 36

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç

1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0.5	10	5.00	50 / 10 / 30 / 10
3	4	FVII	1661	0.25	10	2.50	50 / 10 / 30 / 10
4	4	FVII	1661	0.125	10	1.25	50 / 10 / 30 / 10
5	4	FVII	1661	0.0625	10	0.625	50 / 10 / 30 / 10
6	4	FVII	1661	0.5	10	5	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc lipidi
7	4	FVII	1661	0.25	10	2.50	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc
8	4	FVII	1661	0.125	10	1.25	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc
9	4	FVII	1661	0.0625	10	0.63	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc

Şekil 5, artan PEG- kalkanlamanın C57BL6 farelerinde Ga1NAc aracılı olmayan sessizlikleri azalttığını göstermektedir. Bu, C57BL6 farelerinde hem % 5 hem de % 10 PEG konsantrasyonları ile gösterilmektedir. C18- PEG'nin (yani, PEG- DSG) % 10 mol oranında dahil edilmesi etkili bir şekilde susturmayı engeller, bu da % 0.5 mol PEG lipidin bir eşmolar miktarda Ga1NAc- lipid (yani, Formül III'ün Ga1NAc3- PEG- DSG'si) ile yer değiştirmesiyle)üstesinden gelinebilir. Bu nedenle, artan PEG- koruyucu (örneğin, % 5 mol ila % 10 mol), Ga1NAc aracılı olmayan susturmayı değil, aynı zamanda genel gücü de azaltır.

Benzer deneyler ayrıca sıçanlarda gerçekleştirilir, burada PEG lipidi (PEG- DSG) lipozomlarda hem % 5 hem de % 10 mol ihtiva edildi. Aşağıda Tablo 14, % 5 mol PEG lipidi konsantrasyonuna sahip lipozomlar içeren MC3 ihtiva eden yöntemler için deneysel detay sağlar, burada formülasyonlar sıçanlarda test edildi. Lipozomlar

aşağıdaki molar miktarları içerdi: 50 / 10 / 35 / 5 MC3 / DSPC / Kol / PEG- DSG. Burada % 0.5 Ga1NAc3- PEG ilave edildi, PEG- DSG'nin karşılık gelen miktarı % 4.5 azaltıldı.

Tablo 14

Deneysel Plan

Hayvanlar Sprague- Dawley Sıçanları

Toplam 36

Enjeksiyon Vol. (uL) Bolus enjeksiyon

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	0.2	5	1.00	50 / 10 / 35 / 5
3	4	FVII	1661	0.1	5	0.50	50 / 10 / 35 / 5
4	4	FVII	1661	0.05	5	0.25	50 / 10 / 35 / 5
5	4	FVII	1661	0.025	5	0.125	50 / 10 / 35 / 5
6	4	FVII	1661	0.2,	5	1.00	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
7	4	FVII	1661	0.1	5	0.50	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
8	4	FVII	1661	0.05	5	0.25	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi

9	4	FVII	1661	0.025	5	0.125	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi

Aşağıda Tablo 15, % 10 mol PEG lipidi konsantrasyonuna sahip lipozomlar içeren MC3 ihtiva eden yöntemler için deneysel detay sağlar, burada formülasyonlar sıçanlarda test edildi. Lipozomlar aşağıdaki molar miktarları içerdi: 50 / 10 / 30 / 10 MC3 / DSPC / Kol / PEG- DSG. Burada % 0.5 Ga1NAc3- PEG ilave edildi, PEG- DSG'nin karşılık gelen miktarı % 9.5 azaltıldı.

Tablo 15

Deneysel Plan

Hayvanlar Sprague- Dawley Sıçanları

Toplam 36

Enjeksiyon Vol. (uL) Bolus enjeksiyon

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	1	5	5.00	50 / 10 / 35 / 5
3	4	FVII	1661	0.5	5	2.50	50 / 10 / 35 / 5
4	4	FVII	1661	0.25	5	1.25	50 / 10 / 35 / 5
5	4	FVII	1661	0.125	5	0.625	50 / 10 / 35 / 5
6	4	FVII	1661	1	5	5.00	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi

7	4	FVII	1661	0.5	5	2.50	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
8	4	FVII	1661	0.25	5	1.25	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi
9	4	FVII	1661	0.125	5	0.625	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 5 Ga1NAc lipidi

Şekil 6, belirtilen dozajlarda sıçanlara uygulanmış % 5 mol ve % 10 mol C18 PEG ihtiva eden MC3 formülasyonlarının sonuçlarını göstermektedir. % 10 mol PEG- DSG içeren formülasyonlar, sıçanlarda test edilen konsantrasyonlarda (0.625- 5 mg / kg) az bir sessizlik gösterir. Bununla birlikte, Formül III'e ait % 0.5 mol'lük Ga1NAc3- PEG- DSG'sinin eklenmesi (yani, C18- PEG'nin % 0.5 mol'ünün değiştirilmesi), FVII'nin nakavtını eski haline getirir. Bu nedenle, fareler ile karşılaştırıldığında, sıçanda, daha yüksek ölçüde korunmuş formülasyon genellikle % 5 mol ve % 10 mol PEG konsantrasyonları arasındaki farklılıklarda gösterildiği gibi gücü daha iyi korur.

Örnek 10: % 0.5 mol Ga1NAc3- PEG- DSG'nin dahil edildiği ve edilmediği lipozomal formülasyonlar içeren MC3'te bileşenlerin mol % 'sindeki varyasyonların değerlendirilmesi

Ga1NAc3- PEG- DSG içeren ve içermeyen farklı mol yüzdesi bileşenlerine sahip olan MC3 içeren lipozomların etkinliğini belirlemek için, aşağıdaki lipozomal formülasyonlar, büyük ölçüde yukarıda Örnek 2'de tarif edildiği gibi C57BL6 farelerinde hazırlanmış ve test edilmiştir. Bileşenler, tabloda gösterildiği gibi şu sıra ile sağlanmaktadır: MC3 / DSPC / Chol. / PEG- DSG. Burada % 0.5 Ga1NAc3- PEG ilave edildi, PEG- DSG'nin karşılık gelen miktarı aşağıdaki Tablo 16'daki gibi % 4.5 azaltıldı.

Tablo 16

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL6

Toplam 33

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	3				10		PBS
2	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	50 / 10 / 35 / 5
3	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	50 / 10 / 35 / 4.5 w % 0.5 Ga1NAc3- lipit
4	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	40 / 15 / 40 / 5
5	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	40 / 15 / 40 / 5.5 w % 0.5 Ga1NAc3- lipit
6	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	30 / 25 / 40 / 5
7	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	30 / 25 / 40 / 4.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit
8	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	20 / 35 / 40 / 5
9	3	FVII	1661	0.1	10	1.00	20 / 35 / 40 / 4.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit

Şekil 7'de gösterildiği gibi G1aNAc'nin lipozomal formülasyonlara ilavesi, her formülasyondaki FVII'nin susturulmasını geliştirir, yani, burada MC3 % 50, 40 ve 30 mol olarak bulunmaktadır.

Örnek 11: Doğal Tip ve ASPGR KO farelerinde, MC3 ve Ga1NAc içeren lipozomların etkisi

Çeşitli lipozom formülasyonlarının etkinliğinde ASGPR'nin rolünü incelemek için, yabani tip ve ASGPR nakavt farelerine, AD- 1661 siRNA bileşimini içeren MC3 lipozomları, Örnek 1'de tarif edildiği gibi 3, 1 ve 0.3 mg / kg olarak verilmiştir. Burada % 0.5 Ga1NAc3- PEG ilave edildi, PEG- DSG'nin karşılık gelen miktarı aşağıdaki Tablo 17'de gösterildiği gibi % 9.5 azaltıldı.

Tablo 17

Deneysel Plan

Hayvanlar C57BL6 ve ASPGRr KO

Toplam 25 + 15

Enjeksiyon Vol. (uL) ağırlığa bağlı olarak değişebilir

Grup	Grup boyutu	Hedef	siRNA	Konsan. (mg / mL)	Enj. Hac. (uL / g)	Doz (mg / kg)	Araç
1	5				10		PBS
2	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50 / 10 / 30 / 10
3	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit
4	5	FVII	1661	0.1	10	1.00	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit
5	5	FVII	1661	0.03	10	0.300	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit
6	5	FVII	1661		10		PBS

7	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50 / 10 / 30 / 10
8	5	FVII	1661	0.3	10	3.00	50 / 10 / 30 / 9.5 w % 0.5 Ga1NAc- lipit

Şekil 8, bu deneylerin sonuçlarını göstermektedir ki, GalNAc3- PEG- DSG lipidinin dahil edilmesiyle C18 PEG ihtiva eden formülasyonlarda FVII nakavtının yeniden kazanılmasını, Ga1NAc hedefleme parçası için beklenen reseptör olan Asialoglycoprotein Reseptöründe (ASGPR) eksik olan bir fare suşu içinde uygulandığında ortadan kaldırıldığını göstermektedir.

Örnek 12: Oligonükleotit Sentezi

Sentez

Bütün oligonükleotidler bir AKTAoligopilot sentezleyici üzerinde sentezlenir. Standart koruyucu gruplarla ticari olarak temin edilebilen kontrollü gözenekli cam katı destek (dT- CPG, 500, Prime Synthesis) ve RNA fosforamidleri, 5'- O- dimetoksitritil N6- benzoil- 2'- t- bütildimetilsilil- adenozin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetilfosforamidit, 5'- O- dimetoksitritil- N4- asetil- 2'- t- bütildimetilsilil- sitidin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetilfosforamidit, 5'- O- dimetoksitritil- N2- - isobütiril- 2'- t- bütildimetilsilil- guanozin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetilfosforamidit, ve 5'- O- dimetoksitritil- 2'- t- bütildimetilsilil- üridin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetilfosforamidit (Pierce Nucleic Acids Technologies), oligonükleotid sentezi için kullanıldı. 2'- F fosforamiditler, 5- O- dimetoksitritil- N4- asetil- 2'- fluro- sitidin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetilfosforamidit ve 5'- O- dimetoksitritil- 2'- fluro- üridin- 3'- O- N,N'- diisopropil- 2- siyanoetil- fosforamidit, (Promega) firmasından satın alınır. Bütün fosforamiditler, % 10 THF / ANC (hac. / hac.) içinde 0.2 M konsantrasyonda kullanılan guanozin hariç asetonitril (CH_3CN) içinde 0.2M bir konsantrasyonda kullanılır. 16 dakikalık eşleşme / geri dönüşüm süresi kullanılır. Aktivatör 5- etil tiotetrazol (0.75 M: American International Chemicals) olup, PO- oksidasyon için iyodin / su / piridin kullanılır ve 2,6- lütidin / ACN (1: 1 hac. / hac.) içinde PS- oksidasyon için PADS (% 2) kullanılır.

3'- ligand konjüge edilmiş sarmallar, ilişkili ligand içerikli katı destek kullanılarak sentezlenir. Örneğin, sekans içindeki kolesterolün girişi, bir hidroksiprolinol- kolesterol fosforamidit'ten gerçekleştirilir. Kolesterol, bir hidroksiprolinol- kolesterol kısmının elde edilmesi için bir 6- aminohekzanoat bağlantısı aracılığıyla trans- 4- hidroksiprolinol'e bağlanmıştır. 5'- uç Cy- 3 ve Cy- 5.5 (florofor) etiketli siRNA'lar, Biosearch Technologies firmasından satın alınan, karşılık gelen Quasar- 570 (Cy- 3) fosforamidit'ten sentezlenir. 5'- uç ve ya da iç pozisyona ligandların konjügasyonu, uygun korunmuş ligand- fosforamidit yapı bloğu kullanılarak gerçekleştirilir. 5- (etiltio)- 1 H- tetrazol aktivatörü mevcudiyetinde susuz CH_3CN içinde fosforamidit'in 0.1 M çözeltisinin bir katıya, uzatılmış bir 15 dak. eşlenmesi oligonükleotid bağlanır. İnternükleotidin fosfata oksidasyonu, rapor edildiği (1) gibi standart iyodin- su kullanılarak ya da 10 dak. oksidasyon bekleme zamanlı konjüge edilmiş oligonükleotid ile tert- bütil hidroperoksit / asetonitril / su (10: 87: 3) ile işlemle yürütülmektedir. Fosforotioat, örneğin DDTT (AM Chemicals firmasından satın alınan), PADS ve veya Beaucage ayıracı gibi bir sülfür transfer ayıracı kullanılarak fosfit'in fosforotioat'a oksidasyonu ile girer. Kolesterol fosforamidit kurumda sentezlenir ve diklorometan içinde 0.1 M bir konsantrasyonda kullanılır. Kolesterol fosforamidit için eşleşme zamanı 16 dakikadır.

Korumanın Kaldırılması I (Nükleobaz Korumasının Kaldırılması)

Sentezin tamamlanmasının ardından, destek, bir 100 ml cam şişeye (VWR) transfer edilir. Oligonükleotid, 55 °C'de 6.5 saat boyunca etanolik amonyumun [amonyak: etanol (3: 1)] bir 80 mL'lik karışımı ile baz ve fosfat gruplarının eş zamanlı koruyucu gruptan uzaklaştırılması ile destekten ayrılır. Şişe, buz üzerinde kısaca soğutulur ve daha sonra etanolik amonyak karışımı bir yeni 250 ml şişe içerisine filtre edilir. CPG, etanol / su (1: 1 hac. / hac.) 2 X 40 mL kısımları ile yıkanır. Karışım hacmi daha sonra roto- buhar ile ~ 30 ml'ye azaltılır. Karışım daha sonra boya üzerinde dondurulur ve hızlı vakum üzerinde vakum altında kurutulur.

Korumanın Kaldırılması I (2'- TBDMS grubunun uzaklaştırılması)

Kurutulmuş kalıntı, 26 mL trietilamin, trietilamin trihidroflorit (TEA·3HF) ya da piridin- HF ve DMSO (3: 4: 6) içinde yeniden süspansiyon hale getirilir ve 2' pozisyonda tert-bütildimetilsilil (TBDMS) grupların çıkarılması için 90 dakika boyunca 60 °C'de ısıtılır.

Reaksiyon daha sonra 50 mL 20 mM sodyum asetat ile sulandırılır ve pH 6.5'ye ayarlanır ve saflaştırılana kadar dondurucuda saklanır.

Analiz

Oligonükleotidler, saflaştırma öncesinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilir ve tampon ve kolonun seçimi, sekans ve ya da konjüge edilmiş ligandın doğasına bağlıdır.

HPLC Saflaştırma

Ligand ile konjüge edilmiş oligonükleotidler, ters faz preparatif HPLC saflaştırılır. Konjüge edilmemiş oligonükleotidler, kurumda paketlenen bir TSK jel kolonu üzerinde anyon- değişim HPLC ile saflaştırılır. Tamponlar, % 10 CH_3CN (tampon A) içinde 20 mM sodyum fosfat (pH 8.5) ve % 10 CH_3CN, 1M NaBr (tampon B) içinde 20 mM sodyum fosfat (pH 8.5) olmaktadır. Tam uzunlukta oligonükleotidleri içeren fraksiyonlar havuzda toplanır, tuzdan arındırılır ve liyofilize edilir. Yaklaşık olarak 0.15 OD tuzdan arındırılmış oligonükleotidler, su içinde 150 µl'ye seyreltilir ve daha sonra CGE ve LC / MS analizi için özel şişeler içine pipetlenir. Bileşikler daha sonra LC- ESMS ve CGE ile analiz edilir.

siRNA preparasyonu

siRNA'nin hazırlanması için, eşmolar miktarlarda sens ve antisens sarmalı, 5 dak. boyunca 95 °C'de 1 X PBS içinde ısıtılır ve yavaş bir şekilde oda sıcaklığına soğutulur. Dupleksin bütünlüğü HPLC analizi ile konfirme edilir.

Tablo 18. Luc ve FVII hedefleme için siRNA dupleksleri

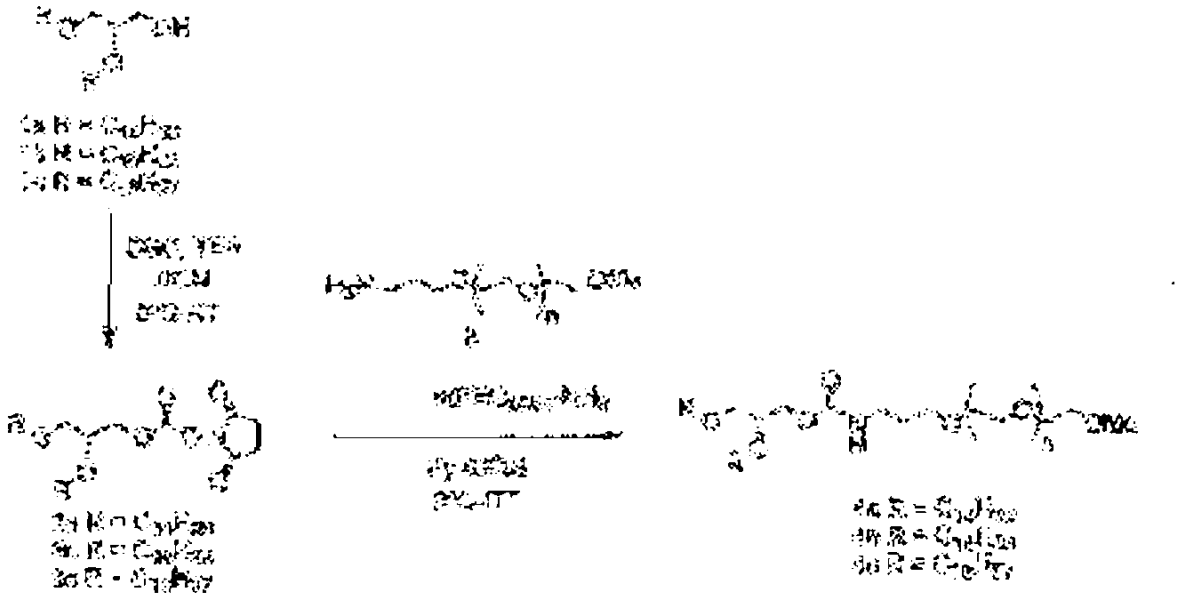
Dupleks	Sek. ID	Sekans 5'- 3'	Hedef
1000 / 1001	1	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT	Luc
	2	UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	
AD- 1955	3	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	Luc
	4	UCGAAGuACUcAGCuAAGdTSDT	

AD- 1596	5	GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT	FVII
	6	GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	
AD- 1661	7	GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT	FVII
	8	GfUAAGAfCfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdTsdT	

Küçük harf, 2'OMe modifikasyonudur ve Nf, bir 2'F modifiyeli nükleobazdır, dT ise deoksitimidin, s, fosfoiyonattır.

Örnek 13: mPEG2000- 1,2- Di- O- alkil- sn3- karbomoilgliserit'in sentezi

mPEG2000- 1,2- Di- O- alkil- sn3- karbomoilgliserit gibi PEG lipitleri aşağıdaki prosedürler kullanılarak sentezlenmiştir:



mPEG2000- 1,2- Di- O- alkil- sn3- karbomoilgliserit

Bileşik 4a'nın (PEG- DMG) hazırlanması: 1,2- Di- O- tetradesil- sn- gliserid **Ia** (30 g, 61.80 mmol) ve N.N'- süksinimidilkarbonat (DSC, 23.76 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (DCM, 500 mL) içine alınır ve bir buzlu su karışımı üzerine karıştırılır. Trietilamin (TEA, 25.30 mL, 3 eşdeğ.), karıştırma çözeltisine ilave edilir ve sonradan reaksiyon karışımının, ortam sıcaklığında bütün gece boyunca karıştırılmasına izin verilir. Reaksiyonun ilerleyişi TLC ile izlenir. Reaksiyon karışımı DCM (400 mL) ile seyreltilir

ve organik katman, su (2 X 500 mL), 15 sulu $NaHCO_3$ çözeltisi (500 mL) akabinde standart düzen ile yıkanır. Elde edilen kalıntı bütün gece boyunca yüksek vakum altında ortam sıcaklığında kurutulur. Kurutmanın ardından, böylece elde edilen ham karbonat **2a**, diklorometan (500 mL) içinde çözünür ve bir buzlu banyo üzerinde karıştırılır. Karıştırılma çözeltisine, $MPEG_{2000}$- NH_2 (**3**, 103.00 g, 47.20 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve susuz piridin (Py, 80 mL, fazlalık) argon altında ilave edilir. Bazı düzenlemelerde, metoksi- (PEG)x- amin, bir 45 ila 49, tercih edilen şekliyle 47- 49 arasında olan ve daha çok tercih edilen şekliyle 49 olan bir x'e sahiptir. Reaksiyon karışımının daha sonra bütün gece boyunca ortam sıcaklığında karıştırılmasına izin verilir. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartılır ve kalıntı, DCM (200 mL) içinde çözünür ve etil asetat içinde silika jelin bir kolonu üzerine yüklenir. Kolon başlangıç olarak etil asetat ile ve sonradan beyaz bir katı olarak (105.30 g, % 83) istenen PEG- Lipit **4a**'yı vermek üzere diklorometan içinde % 5- % 10 metanol'ün gradyanı ile ayrılır. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 M Hz) δ = 5.20- 5.12 (m, 1 H), 4.18- 4.01 (m, 2 H), 3.80- 3.70 (m, 2 H), 3.70- 3.20 (m,- O- CH_2- CH_2- O- , PEG- CH_2), 2.10- 2.01 (m, 2 H), 1.70- 1.60 (m, 2 H), 1.56- 1.45 (m, 4H), 1.31- 1.15 (m, 48H), 0.84 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2660- 2836.

4b'nin hazırlanması: 1.2- Di- O- hekzadesil- sn- gliserid **1b** (1.00 g, 1.848 mmol) ve DSC (0.710 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (20 mL) içinde birlikte alındı ve bir buzlu su karışımı içinde 0 °C'ye soğutuldu. Trietilamin (1.00 mL, 3 eşdeğ.) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi, DCM ile seyreltildi, su (2 kere), $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı ve sodyum sülfat üzerine kurutuldu. Çözücüler azalan basınç altında ayrıştırıldı ve **2b'nin** elde edilen kalıntısı, bütün gece boyunca yüksek vakum altında muhafaza edildi. Bu bileşik, ayrıca saflaştırılmaksızın bir sonraki reaksiyon için doğrudan kullanılmıştır. $MPEG_{2000}$- NH_2 **3** (1.50 g, 0.687 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve **2b** (0.702g, 1.5 eşdeğ.), argon altında diklorometan (20 mL) içinde çözündü. Reaksiyon 0 °C'ye soğutuldu. Piridin (1 mL, fazlalık) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartıldı ve kalıntı, beyaz bir katı olarak (1.46 g, % 76) arzu edilen bileşik **4b** elde etmek üzere kromatografi ile (ilk etil asetat akabinde bir gradyan elüsyon olarak % 5- % 10 MeOH / DCM ile) saflaştırıldı. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.17 (t, J = 5.5 Hz, 1 H), 4.13 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 4.05 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 3.82- 3.75 (m, 2 H),

3.70- 3.20 (m,- O- CH_2- CH_2- O- , PEG- CH_2), 2.05- 1.90 (m, 2 H), 1.80- 1.70 (m, 2 H), 1.61- 1.45 (m, 6H), 1.35- 1.17 (m, 56H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2716- 2892.

4c'nin hazırlanması: 1.2- Di- O- oktadesil- sn- gliserid **1c** (4.00 g, 6.70 mmol) ve DSC (2.58 g, 1.5 eşdeğ.), diklorometan (60 mL) içinde birlikte alınır ve bir buzlu su karışımı içinde 0 °C'ye soğutuldu. Trietilamin (2.75 mL, 3 eşdeğ.) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi, DCM ile seyreltildi, su (2 kere), $NaHCO_3$ çözeltisi ile yıkandı ve sodyum sülfat üzerine kurutuldu. Çözücüler azalan basınç altında ayrıştırıldı ve kalıntı, bütün gece boyunca yüksek vakum altında muhafaza edildi. Bu bileşik, ayrıca saflaştırılmaksızın bir sonraki reaksiyon için doğrudan kullanılmıştır. $MPEG_{2000}$- NH_2 **3** (1.50 g, 0.687 mmol, NOF Corporation (Japonya) firmasından satın alınır) ve **2c** (0.760g, 1.5 eşdeğ.), argon altında diklorometan ((20 mL) içinde çözündü. Reaksiyon 0 °C'ye soğutuldu. Piridin (1 mL, fazlalık) ilave edildi ve reaksiyon bütün gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon TLC ile izlendi. Çözücüler ve uçucular vakum altında çıkartıldı ve kalıntı, beyaz bir katı olarak (0.92 g, % 48) arzu edilen bileşik **4c'yi** elde etmek üzere kromatografi ile (etil asetat akabinde bir gradyan elüsyon olarak % 5- % 10 MeOH / DCM ile) saflaştırıldı. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.22- 5.15 (m, 1 H), 4.16 (dd, J = 4.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 4.06 (dd, J = 5.00 Hz, 11.00 Hz, 1 H), 3.81- 3.75 (m, 2 H), 3.70- 3.20 (m,- O- CH2- CH2- O- , PEG- CH2), 1.80- 1.70 (m, 2 H), 1.60- 1.48 (m, 4H), 1.31- 1.15 (m, 64H), 0.85 (t, J = 6.5 Hz, 6H). Bulunan MS aralığı: 2774- 2948.

Örnek 14: Ekstrüzyon yöntemi için genel protokol

Lipitler (formül I'in katyonik lipidi, DSPC, kolesterol, DMG- PEG) çözünebilirdir ve istenen molar oranına göre etanol içinde karıştırılır. Lipozomlar, pH 5.2'de sodyum asetat tamponuna karıştırılmış lipidlerin eklendiği bir etanol enjeksiyon yöntemiyle oluşturulur. Bu, % 35 etanol içinde spontan lipozom oluşumuyla sonuçlanır. Lipozomlar, en az 2 kez bir 0.08 µm polikarbonat membrandan ekstrüde edilir. Sodyum asetat ve % 35 etanol içinde bir stok siRNA çözeltisi hazırlandı ve yüklenmek üzere lipozoma ilave edildi. SiRNA- lipozom çözeltisi, 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi ve daha sonra seyreltildi. Etanol çıkarıldı ve diyaliz veya teğetsel akış filtrasyonu ile PBS tamponuna değiştirildi.

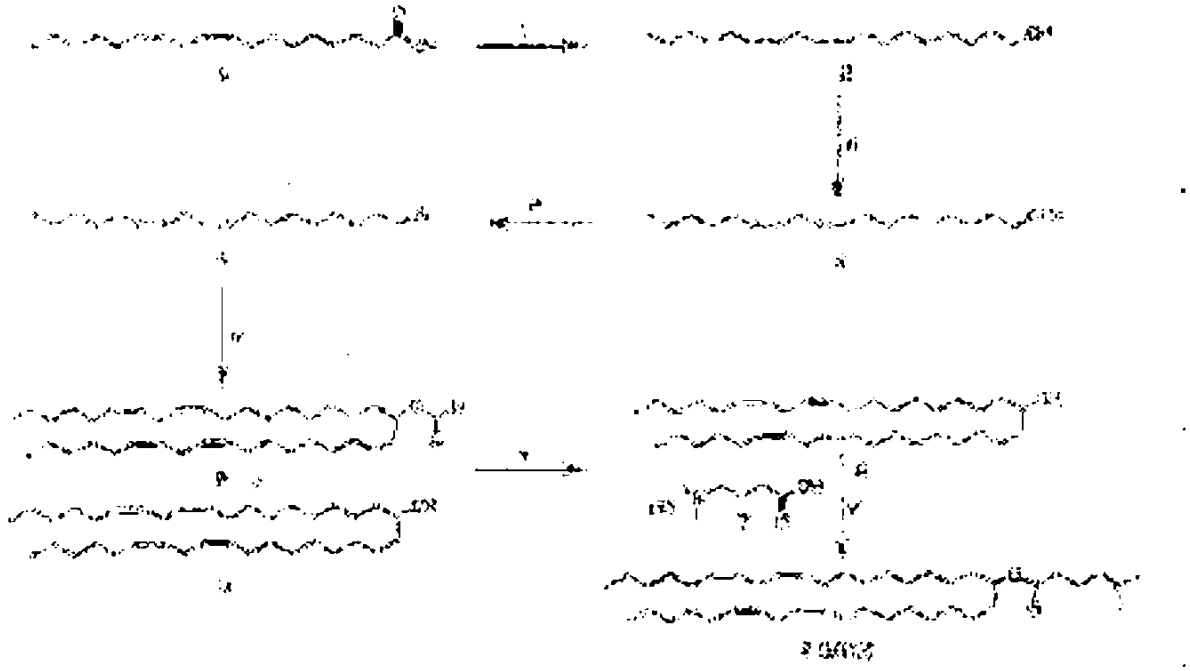
Örnek 15: Hat içi karıştırma yöntemi için genel protokol

Bireysel ve ayrı stok çözeltileri hazırlanır- biri lipit ve diğer siRNA içerir. Formül I'in katyonik lipidini, DSPC, kolesterol ve PEG lipit içeren lipit stok,% 90 etanol içinde çözündürülür. Kalan % 10 düşük pH'lı sitrat tamponudur. Lipit stokunun konsantrasyonu 4 mg / mL'dir. Bu sitrat tamponunun pH'ı, kullanılan füzyojenik lipidin tipine bağlı olarak 3- 5 arasında değişebilir. siRNA ayrıca sitrat tamponu içinde 4 mg / mL'lik bir konsantrasyonda çözündürülür. Küçük ölçekli, her bir stok çözeltisinin 5 mL'si hazırlanır.

Stok çözeltileri tamamen berraktır ve siRNA ile birleştirilmeden önce lipitlerin tamamen çözülmesi gerekir. Bu nedenle stok çözeltileri, lipitleri tamamen çözündürmek için ısıtılabilir. İşlemde kullanılan siRNA'lar modifiye edilmemiş oligonükleotidler olabilir veya modifiye edilebilir ve kolesterol gibi lipofilik kısımlarla konjuge edilebilir.

Tek tek stoklar, her bir çözümü bir T- kavşağına pompalayarak birleştirilir. İki akışın başlangıcını ve duruşunu aynı anda kontrol etmek için çift kafalı Watson- Marlow pompası kullanılır. 1.6 mm'lik bir polipropilen boru, doğrusal akış oranını arttırmak için 0,8 mm'lik bir boruya daha da küçültülür. Polipropilen hattı (ID = 0.8 mm), bir T bağlantısının her iki tarafına bağlanır. Polipropilen T, 4.1 mm^3'lük bir hacim için 1.6 mm'lik bir doğrusal kenara sahiptir. Geniş uçların (1.6 mm) her biri polipropilen hattının herbiri, çözünmüş lipid stokunu veya çözündürülmüş siRNA'yı içeren test tüplerine yerleştirilir. T- bağlantı noktasından sonra, birleşik akımın yayılacağı tek bir boru yerleştirilir. Boru daha sonra 2x hacim PBS ile bir konteynere uzanmaktadır. PBS hızla karıştırılır. Pompa için akış hızı 300 rpm veya 110 mL / dak'lık bir ayardadır. Etanol çıkarılır ve diyaliz ile PBS için değiştirildi. Lipit formülasyonları daha sonra uygun bir çalışma konsantrasyonuna santrifüj veya diafiltrasyon kullanılarak konsantre edilir.

Örnek 16: [(6Z,9Z,28Z,31Z)- heptatriakonta- 6,9,28,31- tetraen- 19- il- 4- (dimetilamino) bütanoat]'ın (formül I'in bir katyonik lipidi ya da MC3) sentezi



i) Vtride / THF; ii) MsCl, Et_3N, DMAP / DCM; iii) LiBr / DMF; iv) Mg, HCOOEt; v) NaOH, THF, Su; vi) EDC, DMAP, DIPEA

Alkol 2'nin hazırlanması

Argon girişi ve termowell ile donatılmış temiz, kuru bir 200L cam reaktör 60 L THF ve 5.73 Kg (20.4 mol) linoleik asit ile dolduruldu. Reaktörün içeriği, bir aseton- kuru buz banyosu kullanılarak 0 ℃'nin altında so ğutuldu. Bu soğuk çözeltiye, tolüen içinde 13.8 L Vitrid (ağırlıkça% 60), reaksiyon karışımının iç sıcaklığının 0 ℃'nin altında tutulmasıyla yavaş yavaş eklenmiştir (Not: Başlangıçtaki vitridinin eklenmesi ekzotermiktir ve köpürme gözlenmiştir. Köpürtme 15 dakika eklendikten sonra durdu). Vitridin eklenmesi 3 saat 45 dakika sürdü. Eklemenin tamamlanmasından sonra, reaksiyon karışımı 2 saat ortam sıcaklığında karıştırıldı. Bir kısım alınmış ve doymuş. Na_2SO_4 ve bu şekilde elde edilen ham ürün, başlangıç asitinin varlığı bakımından TLC ile analiz edildi.

646 / 5000

TLC, reaksiyonun tamamlandığını gösterdi ve reaksiyon karışımı, yaklaşık 45 dakika içinde tekrar 0 ℃'nin altında so ğutuldu. Doymuş bir sodyum sülfat çözeltisi (1.5 L su içinde 1.1 Kg sodyum sülfat çözülerek hazırlanmış) 45 dakika boyunca reaksiyon karışımına yavaş yavaş eklenmiştir. Eklemenin tamamlanmasından sonra, karıştırılarak 30 dakikalık bir süre boyunca 25 L etil asetat eklenmiştir. Elde edilen

reaksiyon karışımı, bir celite yatağından 45 dakikalık bir süre zarfında süzüldü ve selit yatak, kalıntıdan tüm ürünü çıkarmak için 17 L etil asetat ile yıkandı. Birleştirilen organikler düşük basınç altında konsantre edildi. Kalıntı, 15 L etil asetat içerisinde çözündürüldü ve organik tabaka su (2 X 7 L) ile yıkandı ve sodyum sülfat (1.1 Kg) üzerinde kurutuldu. Süzüldükten sonra organik tabaka indirgenmiş basınç altında konsantre edildi ve ürün linoleyil alkolü bir yağ olarak elde etmek için yüksek vakum altında kurutuldu. Ham verim = 5.5 Kg (teorik verim = 5.43 Kg). Bu ürün, bir sonraki aşamada daha fazla saflaştırılmadan kullanıldı.

Linoleil mesilat 3 hazırlamak için proses

Argon girişi ve termowell ile donatılmış temiz, kuru bir 200 L'lik tüm cam reaktör, 45 L DCM ve adım 1'den elde edilen 5.5 Kg ham ürün ile dolduruldu. Bu çözeltiye, 11.5 L trietilamin ilave edildi ve ardından 0.252 Kg (2.0 mol) DMAP eklendi. Çözelti, bir kuru buz aseton karışımı kullanılarak- 10 ℃'ye kadar so ğutuldu ve sıcaklık 3 saattir 0 ℃'nin altında tutulurken bu soğuk reaksiyon kütlesine, bir süre zarfında DCM (10 L) içindeki bir mesil klorid (3.2 L, 41.3 mol) çözeltisi damla damla ilave edildi. . Eklemenin tamamlanmasından sonra, reaksiyon karışımı 1 saat 0 ℃'de karı ştırıldıktan sonra reaksiyon karışımının TLC'si (DCM içinde % 5 EtOAc; PMA lekesi) başlangıç alkolünün tamamen ortadan kalktığını gösterdi. Reaksiyon karışımına, 17 L buz gibi soğuk su eklenmiş ve tabakalar ayrılmıştır. Üst sulu tabaka tekrar 10 L DCM ile yıkandı ve katmanlar ayrıldı. Birleştirilen organik katmanlar, 2 X 10 L seyreltik hidroklorik asit (2 L Konsantrasyonda HCl, 18 L RO su ile karıştırılarak hazırlandı), 2 X 7.5 L su ve 10 L tuzlu su ile (11 Kg NaCl 10 L RO su içinde çözülerek hazırlandı) yıkandı. Organik tabaka ayrıldı, Na_2SO_4 (2.75 Kg) üzerinde kurutuldu ve süzüldü. Organik tabaka, indirgenmiş basınç altında buharlaştırıldı ve açık bir sarı yağ halinde ham mesilatı elde etmek için vakumla kurutuldu. Ham verim = 7.1 Kg (teorik verim = 7.1 Kg). Bu materyal, bir sonraki aşamada bir daha arıtılmadan kullanıldı. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.42- 5.21 (m, 4H), 4.20 (t, 2 H), 3.06 (s, 3 H), 2.79 (t, 2 H), 2.19- 2.00 (m, 4H), 1.90- 1.70 (m, 2 H), 1.06- 1.18 (m, 18H), 0.88 (t, 3 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ = 130.76, 130.54, 128.6, 128.4, 70.67, 37.9, 32.05, 30.12, 29.87, 29.85, 29.68, 29.65, 29.53, 27.72, 27.71, 26.15, 25.94, 23.09, 14.60. MS. $C_{19}H_{36}O_3S$ için hesaplanan moleküler ağırlık, Hesaplanan. 344.53, Bulunan 343.52 (M- H^-).

Linoleil bromür 4'ün hazırlanması

Argon girişi ve termowell ile donatılmış temiz, kuru bir 200 L'lik tüm cam reaktör, 25 L DMF ve adım 2'den elde edilen 7.1 Kg ham ürün ile dolduruldu. Bu karışım aseton-kuru- buz karışımı ile- 10 ℃'ye so ğutuldu. Bu karıştırılan karışıma, reaksiyon sıcaklığı 0 ℃'nin altında tutulurken, 25 ℃ DMF içinde bir I ityum bromür çözeltisi (2.7 Kg, 31.0 mol), 1.5 saat boyunca ilave edildi. Eklemenin tamamlanmasından sonra, reaksiyon karışımı, bir alikotun TLC'si (heksan içinde % 10 EtOAc, PMA boyası), başlangıç mesilatının tamamen kaybolduğunu gösterene kadar, 18- 20 saat boyunca 45 ℃'de karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı 70 L su ile seyreltildi ve 57 L heksanlar ile özü çıkarıldı. Sulu tabaka 2 x 10 L heksanlar ile ekstre edildi ve birleştirilen organik katmanlar (yaklaşık 120 L) tekrar 2 x 10 L su ve 1 X 10 L tuzlu su ile yıkandı (14 Kg sodyum klorürün çözündürülmesiyle hazırlandı). 10 L su). Elde edilen organik tabaka (120 L), sodyum sülfat (4 Kg) üzerinde kurutuldu ve ham ürünü (6.5 Kg) elde etmek için düşük basınç altında konsantre edildi. Ham ürün, elüent olarak heksanlar kullanılarak 60- 120 gözenekli silika jel kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Saf ürünün konsantrasyonu, renksiz bir sıvı olarak bromür 4'ün 5.5 Kg'ını (% 81, üç adım) sağladı. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ = 5.41- 5.29 (m, 4H), 4.20 (d, 2 H), 3.40 (X, J = I Hz, 2 H), 2.77 (t, / = 6.6 Hz, 2 H), 2.09- 2.02 (m, 4H), 1.88- 1.00 (m, 2 H), 1.46- 1.27 (m, 18H), 0.88 (t, / = 3.9 Hz, 3 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ = 130.41, 130.25, 128.26, 128.12, 34.17, 33.05, 31.75, 29.82, 29.57, 29.54, 29.39, 28.95, 28.38, 27.42, 27.40, 25.84, 22.79, 14.28.

Dilinoleilmetanol 6'nın hazırlanması

Argon girişi, geri akış kondenseri ve termowell ile donatılmış temiz, kuru 20 L'lik tüm cam reaktörler gazı alınmış ve argon ile temizlenmiştir. Reaktör 277 g (11.3 mol) aktif magnezyum ve 1.5 L susuz eter ile dolduruldu. Reaktör tekrar üç kere gazdan arındırıldı ve argonla temizlendi. Bromür 4 (2.5 Kg, 7.6 mol) argon altında 5 L susuz eter içinde çözülmüş ve bu çözeltinin IL'si reaktöre eklenmiş, ardından 25 mL (0.35 mol) dibromometan eklenmiştir. Reaktörün içeriği bir su banyosu kullanılarak 40 ℃'ye ısıtıldı (efervesans gözlendi, ardından Grignard reaktif formasyonunun başladığını gösteren geri akış gözlemlendi). Reaksiyonun başlatılmasından sonra, ısıtma reaktörden çıkarıldı ve bromürün geri kalan 4L'si, karışımın hafif bir geri akışını koruyarak 2 saat 30 dakikalık bir süre boyunca yavaşça ilave edildi. Eklemenin tamamlanmasından sonra, reaksiyon karışımı tekrar 1 saat boyunca geri akışa (banyo

sıcaklığı 45 °C) ısıtıldı, daha sonra reaksiyon karışımının bir kısmı su ile söndürüldü ve TLC (Heksanlar, PMA boyası) ile analiz edildi, bu da bromürün tamamen tükendiğini gösterdi. Reaksiyon karışımı, bir buz banyosu kullanılarak 10 °C'nin altında soğutuldu ve eter içinde bir etil format (4 L eter içinde 275 mL) çözeltisi, 2 saat 30 dakikalık bir süre zarfında ilave edildi ve reaksiyonun tamamlanmasından sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına kadar ılıtıldı ve 1 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı tekrar 10 °C'ye kadar soğutuldu ve karışıma yavaşça aseton (1.15 L) eklendi, ardından 7 L buzlu su ve% 10 sülfürik asit çözeltisi eklendi (3.4 L sülfürik asit 34 L buzlu su ile seyreltilerek hazırlandı). Ürün 3 x 10 L eter ile ekstre edildi ve birleştirilen organik tabakalar 10 L tuzlu su ile yıkandı ve sodyum sülfat (2 Kg) üzerinde kurutuldu. Organik tabakanın indirgenmiş basınçta konsantre edilmesi, az miktarda O- formile edilmiş ürün ile birlikte gerekli olan dilinoleyil alkolün bir karışımı olarak ham ürünü (2 Kg) sağladı. Bu ham ürün THF (4L) içinde yeniden çözündürüldü ve 20 litrelik cam reaktörüne dolduruldu. Buna bir NaOH çözeltisi (8 L buzlu su içinde çözülmüş 0.934 Kg) ilave edildi ve içerikler 18 saat 65 °C'de ısıtıldı, daha sonra TLC (heksanla r içinde % 10 eter) gerekli olan dilinoleilmetanol için O- formile edilmiş ürünün, tam dönüşümünü gösterdi. Reaksiyon karışımı soğutuldu ve eter (3 x 4 L) ile özümlendi ve birleştirilen organik katmanlar 5 L tuzlu su ile yıkandı ve sodyum sülfat (4 Kg) üzerinde kurutuldu. Filtrasyon, ardından organik tabakanın konsantrasyonu ham ürünü verdi. Bu şekilde elde edilen ham ürün, hekzan içinde % 4 eter kullanılarak 60- 120 gözenekli silika jel kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf ürün fraksiyonlarının konsantrasyonu, renksiz bir sıvı olarak saf **6** (1.45 Kg,% 80) sağladı. NMR (400 MHz$CDCl_3$) δ 5.47- 5.24 (m, 8H), 3.56 (dd, / = 6.8, 4.2, lH), 2.85- 2.66 (m, 4H), 2.12- 1.91 (m, 9H), 1.50- 1.17 (m, 46H), 0.98- 0.76 (m, 6H). ^{13}C NMR (101 M Hz, CDCl3) δ 130.41, 130.37, 128.18, 128.15, 77.54, 77.22, 76.91, 72.25, 37.73, 31.75, 29.94, 29.89, 29.83, 29.73, 29.58, 29.53, 27.46, 27.43, 25.89, 25.86, 22.80, 14.30.

[(6Z,9Z,28Z,31Z)- heptatriakonta- 6,9,28,31- tetraen- 19- il- 4- (dimetilamino) bütanoat] MC3 (8)'ün hazırlanması:

Dilinoleil metanol 6 (144 g, 272 mmol) 1 L diklorometan içinde çözülmüş ve buna dimetilaminobütirik asit 7'nin hidroklorür tuzu (55 g, 328 mmol) eklenmiş, ardından diizopropiletilamin (70 mL) ve DMAP (4 g) eklenmiştir. 5 dakika karıştırıldıktan sonra. ortam sıcaklığında EDCI (80 g, 417 mmol) ilave edildi ve reaksiyon karışımı, gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı; daha sonra TLC (CH_2Cl_2 içinde % 5 MeOH silika)

analizi, başlangıç alkolünün tamamen ortadan kalktığını gösterdi. Reaksiyon karışımı CH_2Cl_2 (500 mL) ile seyreltildi ve doymuş $NaHCO_3$ (400 mL), su (400 mL) ve brin (500 mL) ile yıkandı. Birleştirilen organik katmanlar, susuz Na_2SO_4 üzerinde kurutuldu ve çözücüler vakumda uzaklaştırıldı. Bu şekilde elde edilen ham ürün (180 g), renksiz bir yağ olarak saf ürün **8**'i izole etmek üzere Flaş kolon kromatografisi [2.5 Kg silika jel, Aşağıdaki elüsyonları kullanarak i) DCM içinde 6L % 0.1 NEt_3 ile doldurulmuş kolon; yüklendikten sonra ii) DCM'de 4 L % 0.1 NEt_3; iii) DCM içerisinde 16L % 2 MeOH- % 98,% 0.1 NEt_3; iv) DCM içerisinde 4L % 2.5 MeOH- % 97.5 % 0.1 NEt3; v) DCM'de 12L % 3 MeOH- % 97 % 0.1 NEt3] ile saflaştırıldı. ^{1}H NMR (400 M Hz, $CDCl_3$): δ 5.46- 5.23 (m, 8H), 4.93- 4.77 (m, lH), 2.83- 2.66 (m, 4H), 2.37- 2.22 (m, 4H), 2.20 (s, 6H), 2.10- 1.96 (m, 9H), 1.85- 1.69 (m, 2 H), 1.49 (d, / = 5.4, 4H), 1.39- 1.15 (m, 39H), 0.95- 0.75 (m, 6H). ^{13}C NMR (101 M Hz, $CDCl_3$): δ 173.56, 130.38, 130.33, 128.17, 128.14, 77.54, 77.22, 76.90, 74.44, 59.17, 45.64, 34.36, 32.69, 31.73, 29.87, 29.76, 29.74, 29.70, 29.56, 29.50, 27.44, 27.41, 25.84, 25.55, 23.38, 22.78, 14.27. El- MS (+ve): $C_{43}H_{79}NO_2$ $(M^+ H)^+$ için hesaplanan MW: 642.6, bulunan: 642.6.

Örnek 17. Önceden oluşturulmuş vesiküller kullanılarak siRNA formülasyonu

Katyonik lipit içerikli partiküller, önceden oluşturulmuş vesikül metodu kullanılarak yapılmıştır. Katyonik lipit, DSPC, kolesterol ve PEG- lipit, etanol içinde sırasıyla 40 / 10 / 40 / 10 molar oranında çözündürülmüştür. Lipit karışımı, sırasıyla % 30 (hac. / hac.) ve 6.1 mg / mL bir nihai etanol ve lipit konsantrasyonuna karıştırılmasıyla bir sulu tampona (50 mM sitrat, pH 4) ilave edilir ve ekstrüksiyon öncesi 2 dak. boyunca oda sıcaklığında dengelenmesine izin verilir. Hidratlı lipitler, Nicomp analizi ile belirlendiği üzere, vesikül çapı 70- 90 nm elde edilene kadar bir Lipex Ekstrüder (Northern Lipids, Vancouver, BC) kullanılarak 22 °C'de iki adet 80 nm'lik gözenek boyutlu filtrelerden (Nuclepore) ekstrüde edilmiştir. Genel olarak 1- 3 arasında geçişleri gerektirir. Küçük vesikülleri oluşturmayan bazı katyonik lipit karışımları için, yardım edilen DSPC baş grubu üzerindeki fosfat grubunun proton eklenmesi için bir düşük pH tamponu (50 mM sitrat, pH 3) ile lipit karışımının hidrate edilmesi, stabil 70- 90 nm vesikülleri oluşturur.

FVII siRNA (bir 50 mM sitrat, % 30 etanol içerikli pH 4 sulu çözeltisi içinde çözünen), 35 °C'ye önceden dengelenmiş vesiküllere ~ 5mL / dak. bir hızda karıştırılarak ilave edilir. Bir nihai hedef sonrası, 0.06 (ağ. / ağ.) siRNA / lipit oranı gerçekleştirilir, karışım, vesikül yeniden organizasyonuna ve FVII siRNA enkapsülasyonuna olanak sağlamak için 35 °C'de ayrıca 30 dak. boyunca enkübe edilir. Etanol daha sonra çıkartılır ve harici

tampon, ya diyaliz ya da teğetsel akım diyafiltrasyonuyla PBS (155 mM NaCl, 3 mM Na_2HPO_4, 1mM KH_2PO_4, pH 7.5) ile yer değiştirir. Nihai enkapsüle edilmiş siRNA- lipit oranı, boyut dışlama döndürme kolonları ya da iyon değişimi döndürme kolonları kullanılarak enkapsüle edilmiş siRNA'nın çıkarılmasının ardından tespit edilir. Doza (mg / kg) karşı kalıntı FVII % 'sini gösteren doz tepkisi eğrisi Şekil 9'da gösterilmektedir.

Örnek 18. Formül I'in bir Katyonik Lipidinin pKa'sını Belirleme

Formül I'e ait katyonik lipidin pKa'sı, esas olarak tarif edildiği gibi (Eastman ve arkadaşları, 1992 Biochemistry 31: 4262- 4268) suda floresan olmayan ancak membranlara bağlandığında gözle görülür derecede floresan hale gelen floresan prob 2- (p- toluidino)- 6- naftalensülfonik asit (TNS) kullanılarak belirlendi. Katyonik lipit / DSPC / CH / PEG- c- DOMG (40: 10: 40: 10 mol oranı) içeren vesiküller, çeşitli pH'lardaki, 2'den 11'e kadar, tamponlarda (13 Mm NaCl, 1 Mm CH_3COONH_4, 1 Mm MES, 1 Mm HEPES) 0.1 mM'ye seyreltildi. Seyreltilmiş vesiküllere bir TNS sulu çözeltisi (1 µM son) bölütü ilave edildi ve 30 saniyelik bir dengeleme periyodundan sonra, TNS içeren çözeltinin flüoresanı, sırasıyla 321 nm ve 445 nm'lik eksitasyon ve emisyon dalga boylarında ölçüldü. Katyonik lipit içeren vesiküllerin pKa'sı, ölçülen floresansın çözeltilerin pH'sına karşı çizilmesi ve verilerin ticari grafik programı IgorPro kullanılarak bir Sigmodial eğrisine yerleştirilmesiyle belirlenmiştir. Formül I'in katyonik lipitine yönelik pKa titrasyon eğrisi, şekil 10'da gösterilmektedir.

SEKANS LİSTESİ

<110> CHEN, JIANXIN

ANSELL, STEVEN

AKINC, AKIN

DORKIN, JOSEPH ROBERT

QIN, XIAOJUN

CANTLEY, WILLIAM

MANOHARAN, MUTHIAH

RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL G.

NARAYANANNAIR, JAYAPRAKASH K.

JAYARAMAN, MUTHUSAMY

<120> LIPID FORMULATION (LİPİD FORMÜLASYONU)

<130> A2038-718210

<140> 12/813,448

<141> 2010-06-10

<150> 61/244,834

<151> 2009-09-22

<150> 61/185,800

<151> 2009-06-10

<160> 79

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 1

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 2

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (5)..(5)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(8)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (12)..(12)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (14)..(17)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 3

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(7)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (11)..(11)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (16)..(16)

<223> 2'-O-Methyl nucleotide (2'-O-Metil nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 4

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 5

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 6

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (3)..(4)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (6)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (13)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (18)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 7

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (1)..(1)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (6)..(8)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (13)..(13)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (16)..(18)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (20) .. (21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 8

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 9

taacgttgag gggcat 16

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 10

ttccatgacg ttcctgacgt 20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (8)..(8)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (17)..(17)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<400> 11

tccatgacgt tcctgacgt 19

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (4)..(4)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<400> 12

taacgttgag gggcat 16

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 13

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (8)..(8)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (17)..(17)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<400> 14

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 15

taagcatacg gggtgt 16

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 16

gatgctgtgt cggggtctcc gggc 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 17

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (2)..(2)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (5)..(5)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (13)..(13)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (21)..(21)

<223> methylated-cytosine (metillenmiş-sitozin)

<400> 18

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 19

tccaggactt ctctcaggtt 20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 20

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 21

tgcatccccc aggccaccat 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 22

gcccaagctg gcatccgtca 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 23

gcccaagctg gcatccgtca 20

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 24

ggtgctcact gcggc 15

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 25

aaccgttgag gggcat 16

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 26

tatgctgtgc cggggtcttc gggc 24

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 27

gtgccggggt cttcgggc 18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 28

ggaccctcct ccggagcc 18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 29

tcctccggag ccagactt 18

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 30

aacgttgagg ggcat 15

<210> 31

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 31

ccgtggtcat gctcc 15

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 32

cagcctggct caccgccttg g 21

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 33

cagccatggt tccccccaac 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 34

gttctcgctg gtgagtttca 20

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 35

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 36

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 36

gtgctccatt gatgc 15

<210> 37

<211> 33

<212> RNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 37

gaguucugau gaggccgaaa ggccgaaagu cug 33

<210> 38

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 38

aacgttgagg ggcat 15

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 39

caacgttatg gggaga 16

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 40

Glu Ala Leu Ala
1

<210> 41

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 41

Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15

Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25

<210> 42

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polipeptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptid)

<400> 42

Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
20 25 30

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 43

```
Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1               5                  10                  15
```

<210> 44

<211> 22

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<400> 44

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Met Ile Trp Asp Tyr Gly
            20
```

<210> 45

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<400> 45

```
Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
            20
```

<210> 46

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<400> 46

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys
            20
```

<210> 47

<211> 22

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<400> 47

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Met Ile Asp Gly Gly Cys
            20
```

<210> 48

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polipeptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptid)

<400> 48

```
Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu
1               5                  10                  15

His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly
            20                  25                  30

Gly Ser Cys
        35
```

<210> 49

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polipeptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik polipeptid)

<400> 49

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly Gly
            20                  25                  30

Ser Cys
```

<210> 50

<211> 21

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Norleucine (Norlösin)

<400> 50

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1               5                  10                  15

Xaa Ile Asp Gly Lys
            20
```

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Influenza A virus (İnfluenza A virüsü)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Norleucine (Norlösin)

<400> 51

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly
20

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila sp.

<400> 52

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus (İnsan immünyetmezlik virüsü)

<400> 53

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 54

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 54

Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20 25

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 55

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala Lys
1 5 10 15

Ser Lys

<210> 56

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 56

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 57

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 58

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 59

```
Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1               5                  10
```

<210> 60

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

```
Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1               5                  10                  15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
            20                  25                  30

Pro Arg Thr Glu Ser
        35
```

<210> 61

<211> 31

<212> PRT

<213> Ascaris suum

<400> 61

```
Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
1               5                  10                  15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg
            20                  25                  30
```

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 63

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp Ile Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
20 25 30

Lys Cys Cys Lys
35

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown (Bilinmiyor)

<220>

<223> Description of Unknown: Unknown bactenecin peptide (Bilinmiyor tarifi: Bilinmeyen baktenesin peptidi)

<400> 64

Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
1 5 10

<210> 65

<211> 42

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<220>

<223> C-term amidated (C-ucu amidatlanmış)

<400> 65

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
35 40

<210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> Unknown (Bilinmiyor)

<220>

<223> Description of Unknown: Unknown indolicidin peptide

<220>

<223> C-term amidated (C-ucu amidatlanmış)

<400> 66

Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
1 5 10

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 67

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik peptid)

<400> 68

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 69

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (12)..(12)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20) .. (21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 70

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 71

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (3)..(3)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (12)..(12)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20) .. (21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 72

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(7)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (16)..(16)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 73

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 74

cuuacgcuga guacuucgat t 21

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 75

ucgaaguacu cagcguaagt t 21

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 76

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<400> 77

guaagacuug agaugaucct t 21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (4)..(5)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(10)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (14)..(17)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (19)..(19)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 78

ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 79

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence (Yapay Sekans)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide (Yapay Sekansın Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide (Kombine DNA/RNA Molekülünün Tarifi: Sentetik oligonükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (2)..(2)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (7)..(9)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (14)..(14)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> modified_base (modifiye_baz)

<222> (17)..(19)

<223> 2'-Fluoro nucleotide (2'-Floro nükleotid)

<220>

<221> misc_feature

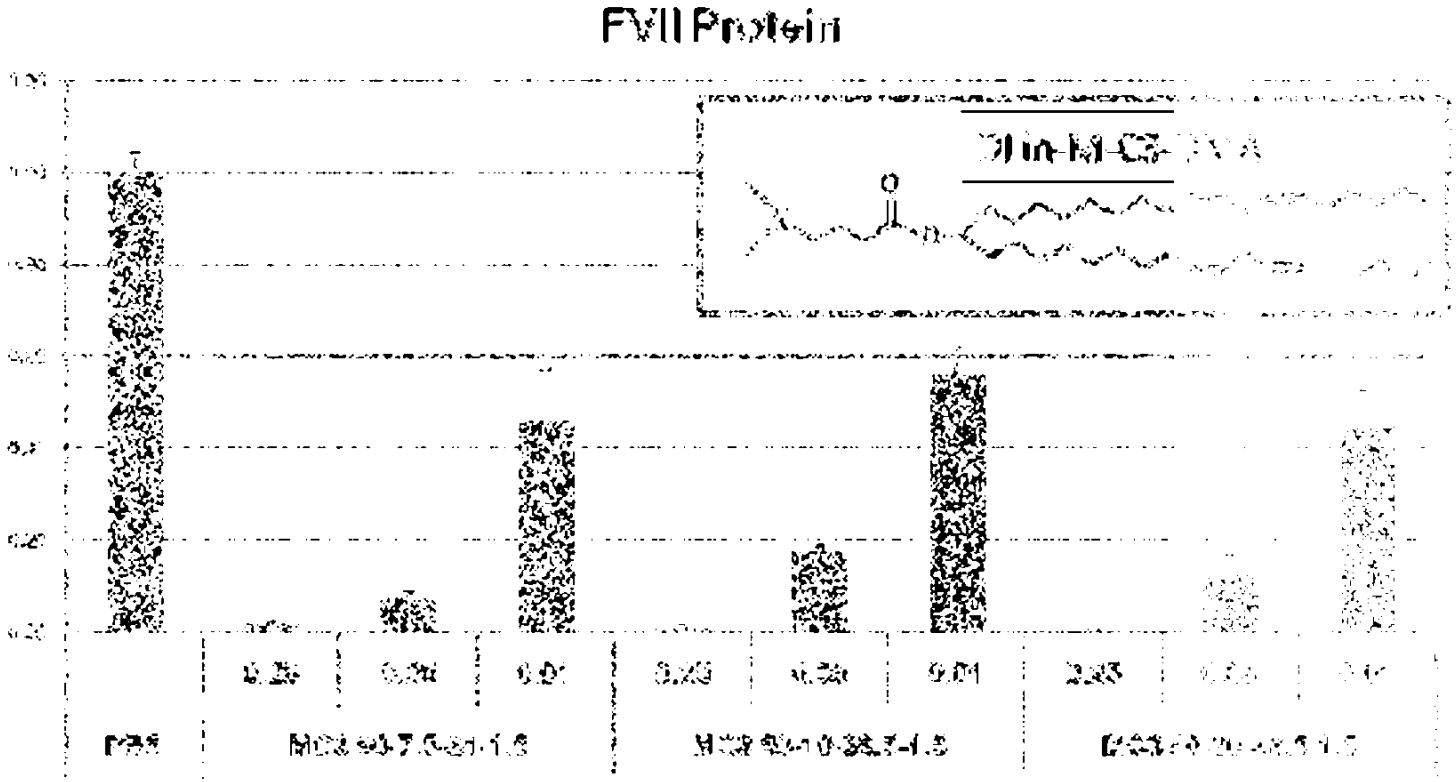
<222> (20) .. (21)

<223> Phosphorothioate linkage (Fosforotioat linkajı)

<400> 79

guaagacuug agaugaucct t 21

Di in-M-C3-DMA: Fare FVII Modelinde Farkli Kompozisyonlarin Degerlendirilmesi



Sekil - 1

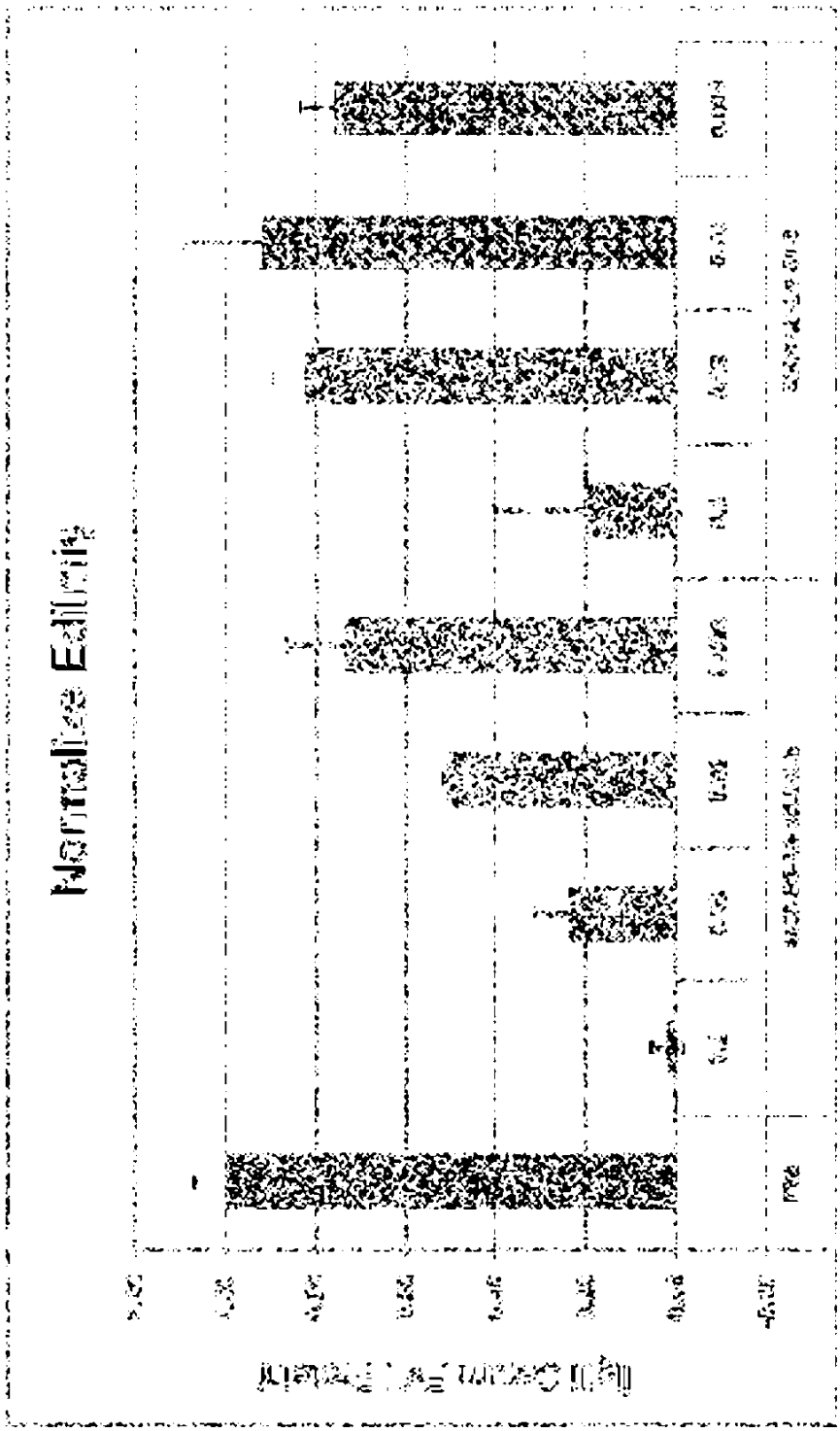
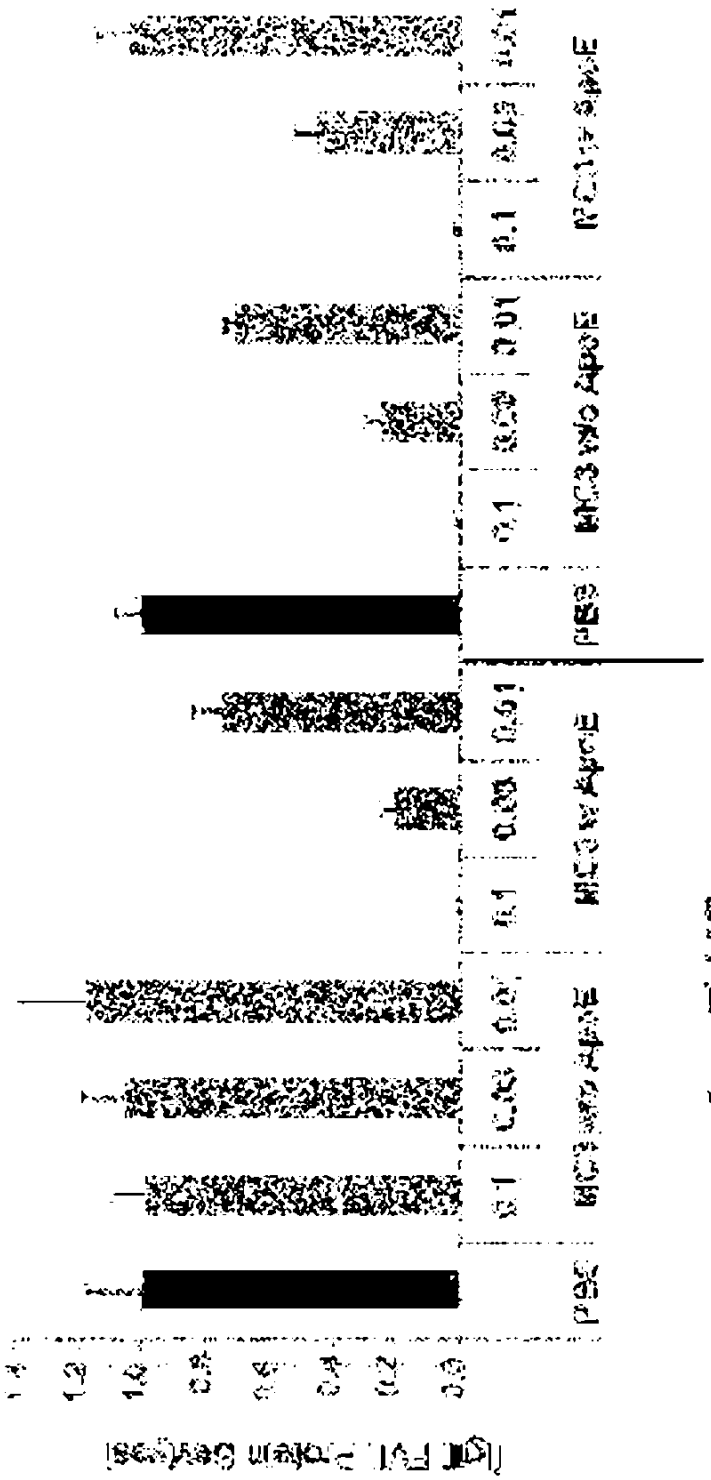
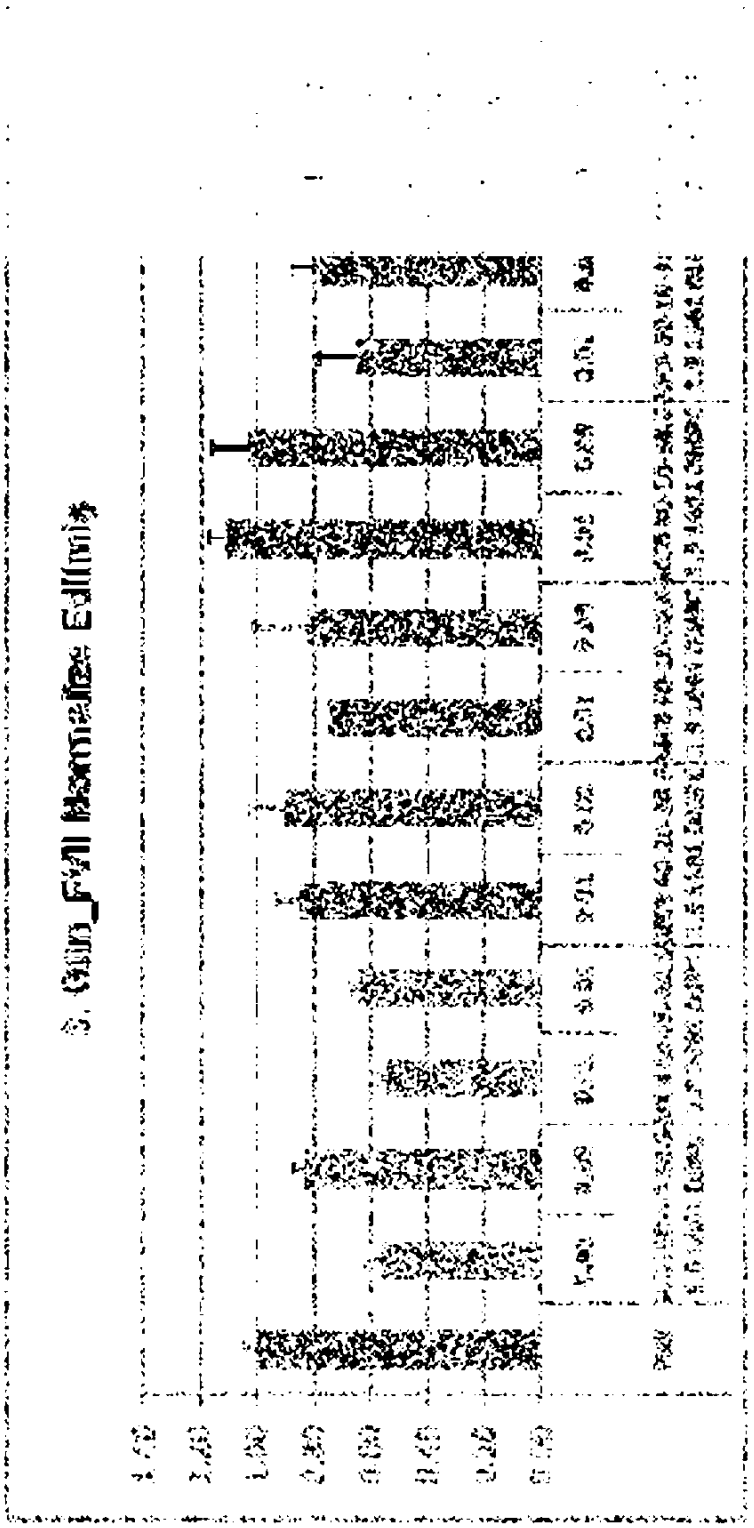
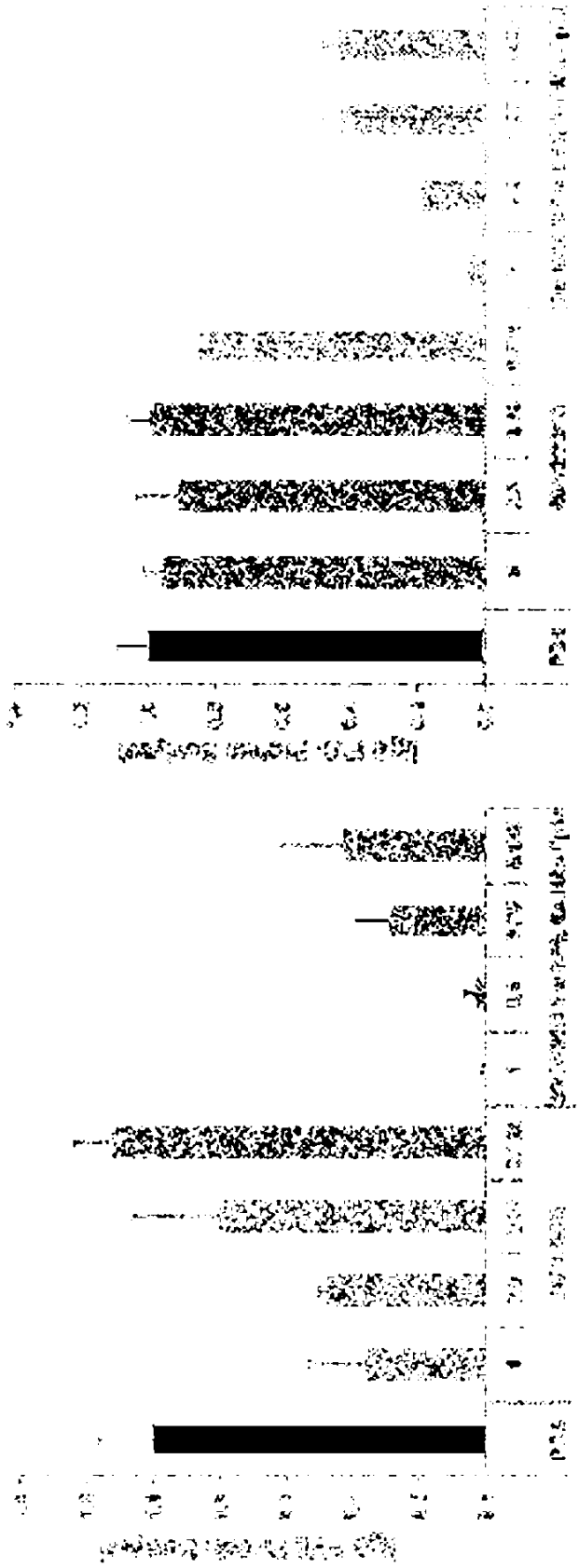


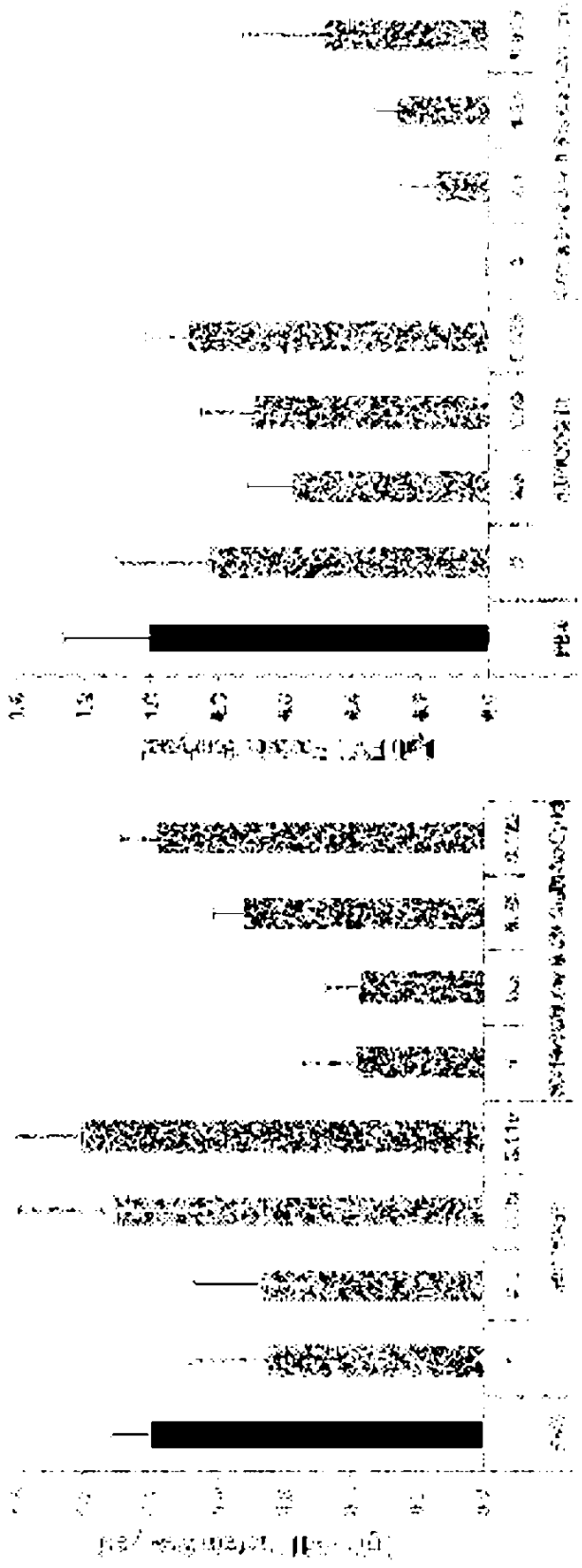
Fig. 2


Total Tau (pg/T)
ApoE KO
Fig. 3



도면 4





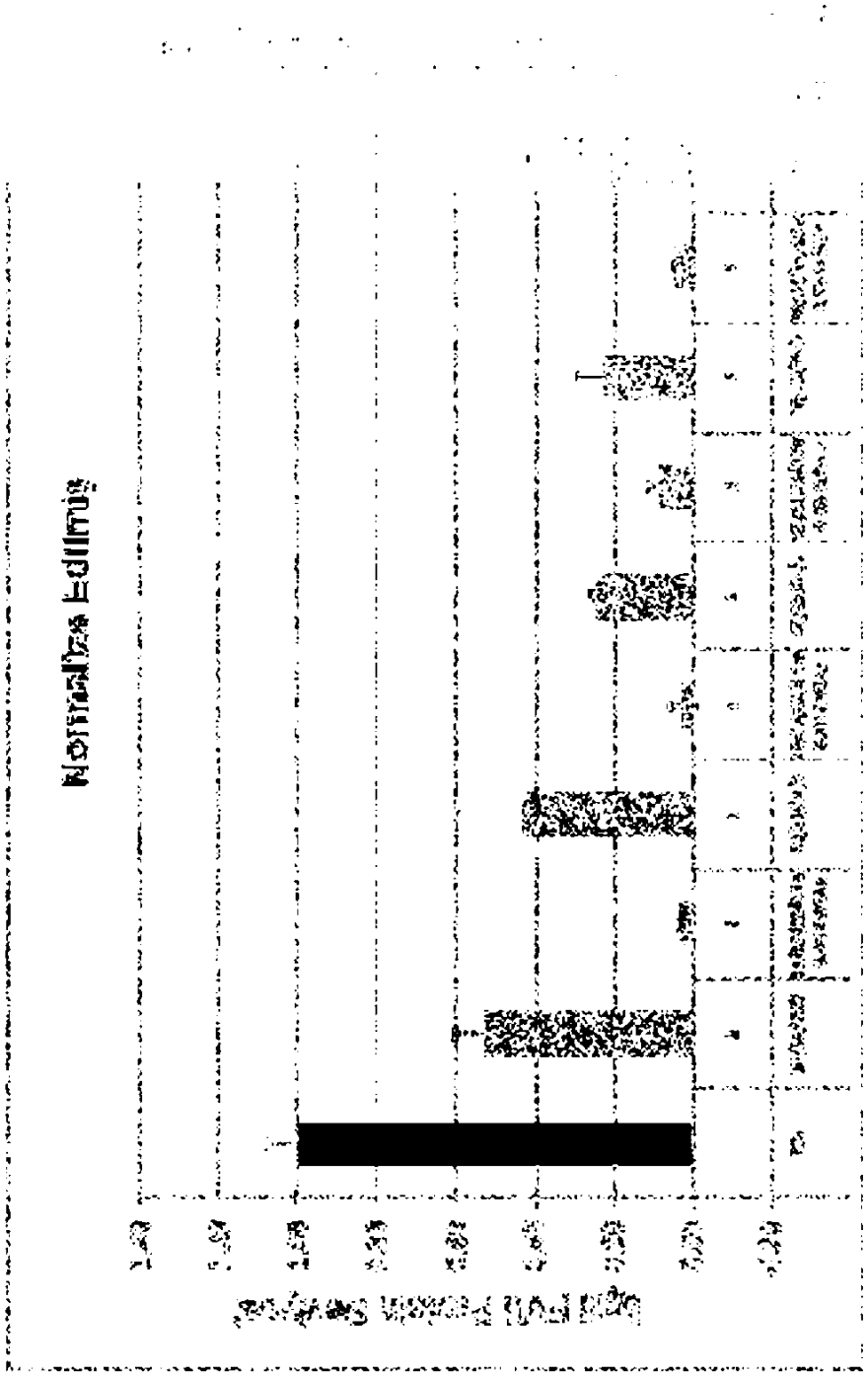
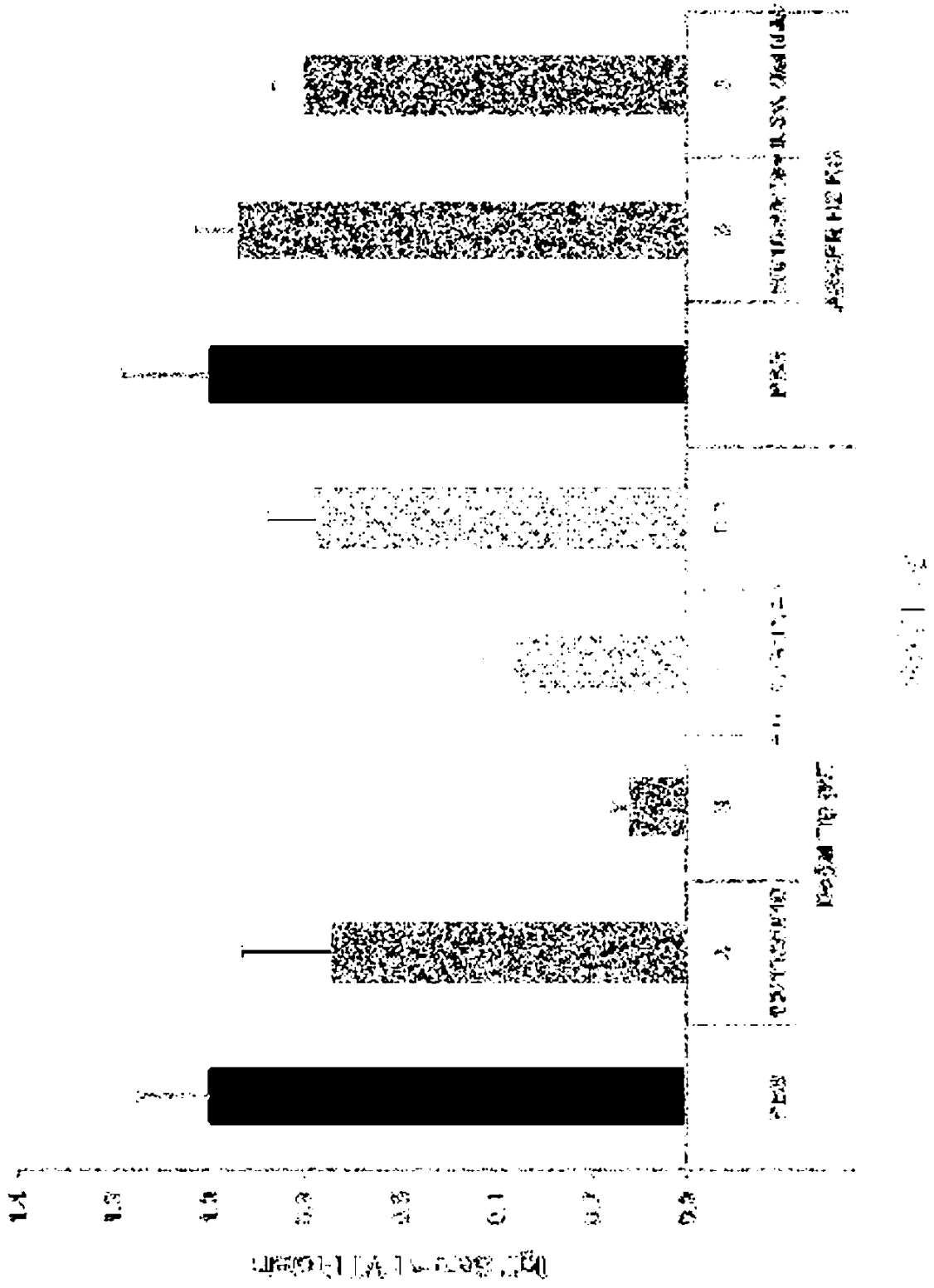


Fig. 7



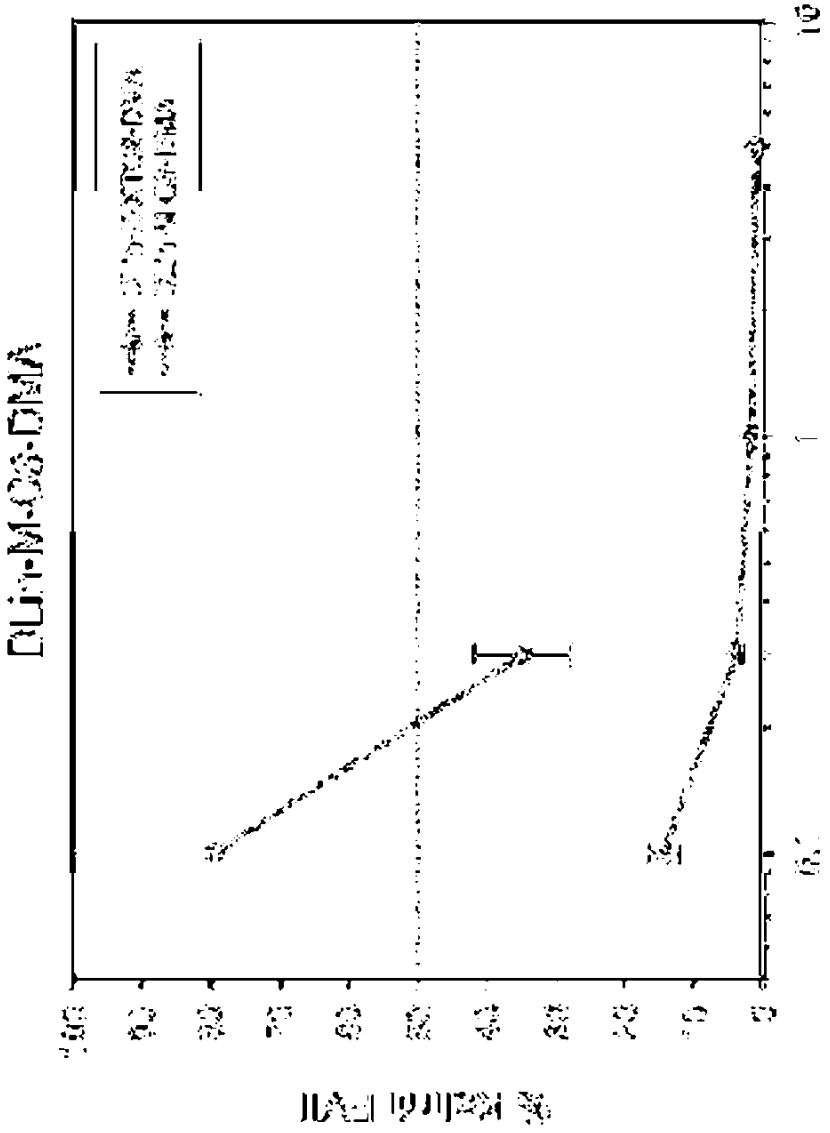
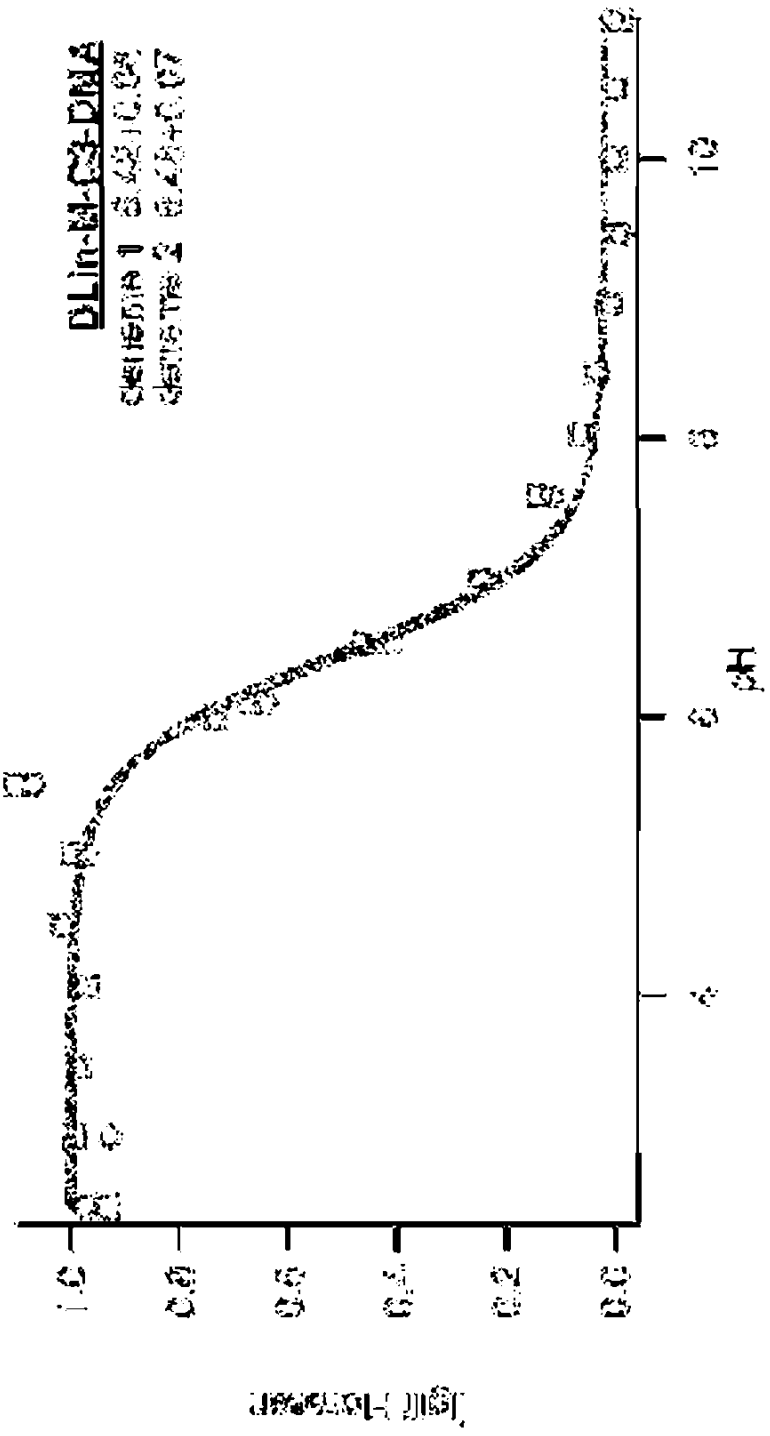


Fig. 3



Şekil - 10