

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991254 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2017.11.22

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РНК, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ ПОНИЖЕННЫМ НЕЦЕЛЕВЫМ ЭФФЕКТОМ

(31) 62/425,907; 62/548,589; 62/561,514

(32) 2016.11.23; 2017.08.22; 2017.09.21

(33) US

(86) PCT/US2017/063078

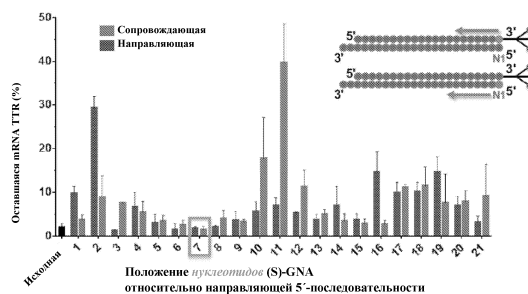
(87) WO 2018/098328 2018.05.31

(71) Заявитель:
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Тейл Кристофер, Милстейн Стюарт,
Шлегель Марк К., Джанас Майя,
Джадхав Васант Р., Фостер Дональд,
Манохаран Мутхиах, Раджив
Каллантхоттатхил Г., Джаяраман
Мутхусами, Кел'ин Александер В.,
Мацуда Шигео, Хариссе Клаус, Наир
Джаяпракаш К., Майер Мартин А.,
Сехгал Алфика, Браун Кристофер
(US)

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

(57) Один аспект настоящего изобретения относится к средству на основе двухнитевой РНК (dsRNA), способному подавлять экспрессию целевого гена. Антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, который находится в затравочной области; dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, и смысловая нить молекулы dsRNA содержит лиганд, где лиганд представляет собой лиганд ASGPR. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим такие молекулы dsRNA, подходящим для терапевтического применения, и способам подавления экспрессии целевого гена посредством введения таких молекул dsRNA, например, для лечения различных болезненных состояний.



A1

201991254

201991254

A1

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ РНК, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ
ПОНИЖЕННЫМ НЕЦЕЛЕВЫМ ЭФФЕКТОМ**

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно § 119(e) 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 62/425907, поданной 23 ноября 2016 г., предварительной заявке на патент США № 62/548589, поданной 22 августа 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/561,514, поданной 21 сентября 2017 г., и содержание каждой из которых включено в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к средствам, представляющим собой дуплекс для RNAi, с определенными мотивами, которые являются преимущественными для подавления экспрессии целевого гена путем снижения нежелательных нецелевых эффектов, а также к композициям для RNAi, подходящим для применения в терапевтических целях. Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы подавления экспрессии целевого гена путем введения этих средств, представляющих собой дуплекс для RNAi, например, для лечения различных заболеваний.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] РНК-интерференция или "RNAi" является термином, который изначально ввел в обращение Fire с сотрудниками для описания наблюдения того, что двухнитевая РНК (dsRNA) для RNAi может блокировать экспрессию гена (Fire et al. (1998) *Nature* **391**, 806-811; Elbashir et al. (2001) *Genes Dev.* **15**, 188-200). Короткая dsRNA управляет ген-специфичным посттранскрипционным сайленсингом у многих организмов, в том числе у позвоночных, и обеспечила новый инструмент для изучения функции генов. RNAi опосредуется РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC), специфичной к последовательности, многокомпонентной нуклеазой, которая разрушает матричные РНК, гомологичные инициатору сайленсинга. Известно, что RISC содержит короткие РНК (длиной

примерно 22 нуклеотида), происходящие из двухнитевой РНК-инициатора, однако белковые компоненты этого активного комплекса остаются неизвестными.

[0004] Одним из нецелевых эффектов siRNA является miRNA-подобный эффект – белок Argonaute, центральный эффектор при РНК-интерференции, воздействует на siRNA, которую вводят искусственно в качестве miRNA (microRNA) с целью индукции РНК-интерференции. (Lam et al. (2015) *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2015) 4, e252). Главным образом miRNA распознает целевой ген посредством спаривания оснований между затравочной областью (положения 2–9 на 5'-конце) и целевой mRNA для супрессии гена. Нецелевые эффекты, обусловленные siRNA, происходят из комплементарности оснований затравочных областей RISC-загруженной антисмысловой нити siRNA и одной или нескольких mRNA. В нескольких исследованиях были описаны miRNA-подобные нецелевые эффекты siRNA, и они оказывают влияние на экспрессию многочисленных генов, в зависимости от последовательностей затравочных областей, и являются достаточно серьезными, чтобы обуславливать до 30% положительных хитов при фенотипическом скрининге на основе siRNA. Кроме того, в случае miRNA также заявлено, что они обеспечивают сайленсинг целевых генов посредством компенсаторных спариваний в своих 3'-концевых областях (компенсаторное 3'-спаривание), если взаимодействия между затравочной областью и мишенями становятся слабыми, что подразумевает, что miRNA-подобные нецелевые эффекты, вероятно, опосредованы таким механизмом.

[0005] Таким образом, проводятся постоянные попытки устранения или снижения miRNA-подобных нецелевых эффектов siRNA путем модулирования конструирования siRNA с помощью разумного применения химических модификаций без нарушения эффективности в отношении сайленсинга генов генных терапевтических средств на основе siRNA. Настоящее изобретение направлено на данную попытку.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение предусматривает эффективные нуклеотидные или химические мотивы для молекул dsRNA, которые

являются преимущественными для подавления экспрессии целевых генов, при этом характеризуются сниженными нецелевыми эффектами в отношении сайленсинга генов, а также композиции для RNAi, подходящие для терапевтического применения.

[0007] Авторы настоящего изобретения обнаружили, среди прочего, что молекулы dsRNA, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и молекула dsRNA характеризуется температурой плавления в диапазоне от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, могут быть более эффективными в опосредовании РНК-интерференции, чем исходная молекула dsRNA, не имеющая дестабилизирующей модификации.

[0008] Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) температура плавления (T_m) составляет от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; (ii) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (iii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iv) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (v) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (vi) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (vii) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (viii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (ix) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[0009] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2-9, предпочтительно 3-8, 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) температура плавления (T_m) составляет от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; (ii) антисмысловая нить содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 2'-ОМе-модификаций; (iii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iv) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (v) смысловая нить содержит 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 2'-ОМе-модификаций; (vi) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (vii) dsRNA содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 2'-дезоксид-модификаций; (viii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (ix) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[0010] В некоторых вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления, находящейся в пределах диапазона с нижней границей от приблизительно 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C или 65°C и с верхней границей диапазона до приблизительно 70°C, 75°C или 80°C. В некоторых вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления в диапазоне от приблизительно 55°C до приблизительно 70°C. В некоторых вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления в диапазоне от приблизительно 57°C до приблизительно 67°C. В некоторых конкретных вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления в диапазоне от приблизительно 60°C до приблизительно 67°C. В

некоторых дополнительных вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления в диапазоне от приблизительно 62°C до приблизительно 66°C.

[0011] Авторы настоящего изобретения также открыли, что молекулы dsRNA, характеризующиеся температурой плавления, составляющей по меньшей мере 60°C, являются более эффективными *in vivo* и *in vitro*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления dsRNA характеризуется температурой плавления, составляющей по меньшей мере 60°C.

[0012] Авторы настоящего изобретения также открыли, что для большей эффективности молекул dsRNA *in vivo* должно присутствовать по меньшей мере 40–50% антисмысловой нити после введения на 7 день *in vivo*, например в печени мыши.

[0013] В другом аспекте в настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ доставки молекулы dsRNA по настоящему изобретению к конкретной мишени в субъекте путем подкожного или внутривенного введения. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены молекулы dsRNA по настоящему изобретению для применения в способе доставки указанных средств к конкретной мишени в субъекте путем подкожного или внутривенного введения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] Данный патент или файл заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или публикации заявки на патент с цветным(-ыми) графическим(-и) материалом(-ами) будут предоставлены в Ведомство после запроса и оплаты необходимой пошлины.

[0015] На **фиг. 1** показаны некоторые иллюстративные дестабилизирующие модификации по настоящему изобретению.

[0016] На **фиг. 2** показан эффект положения одной модификации с помощью (S)-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) в антисмысловой нити в отношении активности конъюгата *in vitro*. Однократное замещение с помощью (S)-GNA хорошо переносится в антисмысловой затравочной области или в участке, противоположном ей (положения 5–8 антисмысловой нити), но не переносится в

чувствительных положениях (положения 1 и 2 антисмысловой нити и положения 11 и 12 смысловой нити)

[0017] На **фиг. 3** показано, что иллюстративная dsRNA согласно настоящему изобретению имела эквивалент в отношении целевой активности по сравнению с исходной dsRNA.

[0018] На **фиг. 4** показано, что иллюстративная dsRNA по настоящему изобретению не характеризовалась нецелевой активностью при высоких дозах.

[0019] На **фиг. 5** показано, что иллюстративные dsRNA по настоящему изобретению характеризовались сравнимым нокдауном генов (GO1 и TTR) в гепатоцитах крысы.

[0020] На **фиг. 6** показано, что иллюстративные dsRNA по настоящему изобретению обеспечивают уменьшение эндогенных нецелевых эффектов. Как видно, обе dsRNA обеспечивали в значительной степени уменьшение числа генов, которые подвергались понижающей или повышающей регуляции с помощью их соответствующих исходных dsRNA.

[0021] На **фиг. 7** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению имеют эффективность, сравнимую с исходной dsRNA.

[0022] На **фиг. 8** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению имеют накопление в печени, сравнимое с исходной dsRNA.

[0023] На **фиг. 9** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению имеют целевую активность, сравнимую с исходной dsRNA.

[0024] На **фиг. 10** показаны параметры лабораторной диагностики иллюстративных dsRNA, вводимых при различных концентрациях.

[0025] На **фиг. 11** показаны нормализованное прибавление веса тела и весовое соотношение печени/тела при введении иллюстративной dsRNA по настоящему изобретению.

[0026] На **фиг. 12** показана корреляция между ΔT_m и целевой и нецелевой типами активности среди указанных положений различных последовательностей. Синие точки данных=целевая активность; красные точки данных=нецелевая активность.

[0027] На **фиг. 13** показан эффект температуры плавления dsRNA-дуплекса в отношении активности *in vitro* и *in vivo*.

[0028] На **фиг. 14** показано, что иллюстративная dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовалась сравнимой эффективностью, но пониженной нецелевой активностью *in vitro* (PMH) по сравнению с исходной dsRNA.

[0029] На **фиг. 15** показано, что иллюстративная dsRNA характеризовалась сравнимой эффективностью *in vivo* (грызуны) по сравнению с исходной dsRNA.

[0030] На **фиг. 16** показано, что гепатотоксичность снижена у крыс, в отношении которых применяли иллюстративную dsRNA по настоящему изобретению (ESC+) по сравнению с исходной dsRNA (ESC).

[0031] На **фиг. 17** показано, что иллюстративная dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовалась 6-8-кратным улучшением терапевтического индекса *in vivo* (крысы) по сравнению с исходной dsRNA.

[0032] На **фиг. 18 и 19** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовалась сравнимой IC50 в отношении целевой активности, но намного более низкой нецелевой активностью при сравнимых концентрациях по сравнению с исходной dsRNA, AD-61444 (**фиг. 18**) и AD-77407 (**фиг. 19**) в системе с COS-люциферазой.

[0033] На **фиг. 20** показано, что замены с помощью GNA и 2'-F в иллюстративных положениях согласно настоящему изобретению не имеют неблагоприятного эффекта в отношении активности *in vivo* по сравнению с исходной dsRNA. Последовательности dsRNA перечислены в **таблице 9**.

[0034] На **фиг. 21** показано, что иллюстративная dsRNA согласно настоящему изобретению обеспечивает снижение нецелевых эффектов. RNAseq из клеток Hep3B, трансфицированных 10 нМ siRNA, 16 ч. обработки.

[0035] На **фиг. 22** показано, что иллюстративная dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовалась сравнимой активностью при однократной дозе у отличных от человека приматов по сравнению с исходной dsRNA при различных дозировках.

[0036] На **фиг. 23** показаны схема исследования для исследований *in vivo* на мышах и иллюстративные dsRNA для данного исследования. Последовательности для последовательностей dsRNA перечислены в **таблице 9**.

[0037] На **фиг. 24 и 25** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовались сравнимой IC50 в отношении целевой активности, но небольшой нецелевой активностью или ее отсутствием при сравнимых концентрациях по сравнению с исходной dsRNA в системе с COS-люциферазой.

[0038] На **фиг. 26 и 27** показано, что иллюстративные dsRNA согласно настоящему изобретению характеризовались сравнимым с исходной dsRNA нокдауном генов в печени, несмотря на пониженный уровень накопления в печени.

[0039] **фиг. 28** представляет собой схематическое изображение структур (S)-GNA и (R)-GNA.

[0040] На **фиг. 29** показаны значения угла наклона остова-основания (η_B) и витка спирали для А-формы и В-формы РНК/ДНК, а также для (S)-GNA. Значения для (R)-GNA экстраполированы из значений (S)-GNA с применением простой инверсии.

[0041] **фиг. 30** представляет собой схематическое изображение термической модуляции конъюгированных siRNA-дуплексов с применением GNA.

[0042] **фиг. 31** представляет собой схематическое изображение структуры hAgo2, по материалам файла PDB 4W50 и полученной с применением PyMOL.

[0043] На **фиг. 32А и 32В** показаны специфическая в отношении положения метаболическая стабильность иллюстративных dsRNA *in vivo* и влияние метаболической стабильности на итоговую фармакодинамику. .

[0044] На **фиг. 32С** показано, что термическая стабилизация смысловой нити, противоположной модифицированной GNA нити, улучшает метаболическую стабильность и эффективность иллюстративных dsRNA.

[0045] **фиг. 33** представляет собой линейный график, на котором показан анализ термического плавления (T_m) (S)-GNA-содержащих иллюстративных siRNA-дуплексов.

[0046] На **фиг. 34А–34F** показан анализ кристаллической структуры РНК-дуплексов, модифицированных с помощью обоих стереоизомеров GNA-T.

[0047] На **фиг. 35** показаны структуры нуклеотидов изоцитидина и изогуанозина и их потенциал к образованию полностью комплементарных пар оснований с "повернутой" GNA-C или GNA-G.

[0048] На **фиг. 36** показан эффект положения единичной замены пары оснований (S)-GNA в отношении сайленсинга *in vitro*. Пара оснований в указанном положении направляющей нити заменяли на соответствующую пару оснований GNA.

[0049] **фиг. 37А и 37В** представляют собой столбчатые графики, на которых показан нокдаун TTR у мышей с помощью модифицированных (S)-GNA siRNA-дуплексов при дозе 2,5 мг/кг. На **фиг. 37А** показаны уровни mRNA TTR, измеренные в печени. На **фиг. 37В** показаны уровни белка TTR, измеренные в сыворотке крови. Планки погрешностей представляет собой SD от каждой когорты (n=3). На графике показаны только те сравнения, которые являются статистически значимыми; все остальные являются не значимыми, кроме всех сравнений с PBS, все из которых значимы. G=направляющая нить, P=сопровождающая нить.

[0050] На **фиг. 38А–38D** показано, что блокирование загрузки RISC уменьшает гепатотоксичность. На **фиг. 38А** изображены структуры аналогов нуклеотидов, применяемых на 5'-концах siRNA для предотвращения 5'-фосфорилирования с уменьшением таким образом загрузки RISC. **фиг. 38В** представляет собой столбчатые графики, на которых показаны показатели воздействия в печени для исходных (RNAi-активных) и кэппированных (RNAi-неактивных) GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на крысах и мышях, оцененные с помощью RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS) при вскрытии (nx). Пунктирные вертикальные линии разделяют исследования, проводимые по отдельности. На **фиг. 38С** показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного

ANOVA в GraphPad Prism 7. ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. **Фиг. 38D** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. У крысы гепатотоксичные siRNA (в данном случае показана siRNA-1) характеризовались гепатоцеллюлярной дегенерацией (область, выделенная скобкой), увеличением количества синусоидных клеток по причине гиперплазии клеток Купфера и/или инфильтрации лейкоцитов (#), некрозом одиночных клеток (*), повышенными показателями митоза (^) и гепатоцеллюлярной вакуолизацией (стрелка). У мыши гепатотоксичные siRNA (в данном случае показана siRNA-7) ассоциированы с некрозом одиночных клеток и более низкой частотой возникновения и тяжестью других наблюдаемых признаков, обычно видимых у крысы. Кэппированные RNAi-неактивные siRNA характеризовались минимальной вакуолизацией или отсутствием гистологических наблюдаемых признаков у обоих видов. Клиренс из цитоплазмы, имеющий место у мышей, согласовывался с уровнем гликогена по причине неполного голодания и не рассматривался в связи с тестируемым изделием.

[0051] На **фиг. 39А-39С** показаны эффекты 5'-модификаций антисмысловой нити на активность в отношении RNAi и уровни повышения ферментов в печени токсичных GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на крысах. **Фиг. 39А** представляет собой столбчатый график, на котором показана загрузка RISC в печени с помощью GalNAc-siRNA с 5'-кэп-структурами или без них, оцененная при вскрытии (nx) с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS). **Фиг. 39В** представляет собой столбчатый график, на котором показан нокдаун mRNA в печени с 5'-кэп-структурами или без них, оцененный при вскрытии с применением RT-qPCR в отношении целевой mRNA и нормализованный относительно конститутивной mRNA (18S rRNA) по сравнению с контрольной группой с солевым раствором. На **фиг. 39С** показаны уровни аспартатаминотрансферазы (AST), щелочной фосфатазы (ALP) и общего билирубина (TBILI) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии для исследований блокирования загрузки

RISC. Q2d, введение дозы через день; iB, инвертированный с удаленным азотистым основанием; Mo, морфолино; H, 5'-дезоксид.

[0052] На **фиг. 40А–40С** показаны эффекты 5'-модификации смысловой нити в отношении гепатотоксичности иллюстративной токсичной GalNac-siRNA в исследованиях токсичности на крысах. **Фиг. 40А** представляет собой столбчатый график, на котором показаны показатели воздействия в печени для токсичной GalNac-siRNA с модификациями на 5'-конце смысловой нити (SS) или без них в исследованиях токсичности на крысах, оцененные при вскрытии (nx) с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS). На **фиг. 40В** показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. **Фиг. 40С** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. Токсичная siRNA характеризовалась выявленными с помощью микроскопа наблюдаемыми признаками, состоящими из гепатоцеллюлярной дегенерации (скобка), некроза одиночных клеток (*), увеличения количества синусоидных клеток, согласующегося с гиперплазией клеток Купфера и/или инфильтрацией лейкоцитов (#), и гепатоцеллюлярной вакуолизации (стрелка). Добавление кэп-структур в смысловую нить на имело эффекта в отношении частоты возникновения или тяжести наблюдаемых признаков. Q2d, введение дозы через день; iB, инвертированный с удаленным азотистым основанием; Mo, морфолино.

[0053] На **фиг. 41А–41С** показаны эффекты 5'-модификаций в отношении гепатотоксичности иллюстративной нетоксичной GalNac-siRNA в исследованиях токсичности на крысах. **Фиг. 41А** представляет собой столбчатый график, на котором показаны показатели воздействия в печени для нетоксичной GalNac-siRNA с модификациями на 5'-конце как смысловой нити, так и антисмысловых нитей или без них в исследованиях токсичности на крысах, оцененные при вскрытии (nx) с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS). На **фиг. 41В** показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. **Фиг. 41С** представляет собой изображения, на которых

показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. Введение известной нетоксичной siRNA с 5'-кэп-структурами или без них приводит к минимальной гепатоцеллюлярной вакуолизации (стрелка) в обоих случаях. Q2d, введение дозы через день; iV, инвертированный с удаленным азотистым основанием; Mo, морфолино.

[0054] На **фиг. 42A–42E** показано, что изменение химических модификаций siRNA не обеспечивает уменьшение гепатотоксичности. На **фиг. 442A** показаны характеристики химических модификаций GalNAc-siRNA с высоким уровнем 2'F и низким уровнем 2'F с одинаковым содержанием PS и последовательностью. **фиг. 42B** представляет собой столбчатые графики, на которых показаны показатели воздействия в печени в исследованиях токсичности на крысах и мышах, оцененные с помощью RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS) при вскрытии (nx). **фиг. 42C** представляет собой столбчатый график, на котором показана загрузка RISC в печени, оцененная с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити при вскрытии. На **фиг. 42D** показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного ANOVA в GraphPad Prism 7. ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. **фиг. 42E** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. У крысы соединения siRNA-6 как с высоким уровнем 2'F, так и низким уровнем 2'F были ассоциированы с гепатоцеллюлярной дегенерацией (скобка), некрозом одиночных клеток (*), увеличением количества синусоидных клеток, согласующимся с гиперплазией клеток Купфера и/или инфильтрацией лейкоцитов (#), и гепатоцеллюлярной вакуолизацией (стрелка). У мыши наблюдаемые признаки соответствовали некрозу одиночных клеток в случае моделей обеих химических модификаций.

[0055] **фиг. 43** представляет собой столбчатый график, на котором показана эффективность in vivo версии с высоким уровнем

2'F (48% 2'F и 52% 2'OMe) и версии с низким уровнем 2'F (21% 2'F и 79% 2'OMe) siRNA-6. После однократной подкожной инъекции 3 мг/кг самкам мышей C57BL/6 оценивали нокдаун целевой mRNA в печени на 14 и 28 дни с применением RT-qPCR в отношении целевой mRNA и нормализовали относительно конститутивной mRNA (GAPDH) по сравнению с контрольной группой с солевым раствором.

[0056] На **фиг. 44А-44Е** показано, что обращение активности загруженного антисмысловой нитью RISC уменьшает гепатотоксичность. **фиг. 44А** представляет собой схему исследования, на которой показано предупреждение и лечение токсичности у крыс с помощью GalNAc-siRNA с применением REVERSIR™. **фиг. 44В** представляет собой столбчатый график, на котором показаны показатели воздействия в печени для GalNAc-siRNA в исследованиях предупреждения (siRNA-1 и siRNA-4) или лечения (siRNA-5) токсичности у крыс, оцененные с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS) при вскрытии (nx). **фиг. 44С** представляет собой столбчатый график, на котором показана загрузка RISC в печени с помощью обработки REVERSIR™ или без нее, оцененная с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити при вскрытии. На **фиг. 44D** показаны уровни глутаматдегидрогеназы (GLDH) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного ANOVA в GraphPad Prism 7. ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. **фиг. 44Е** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. Известные токсичные siRNA, вводимые отдельно или со скремблированным контролем (Ctr) REVERSIR™ были ассоциированы с гепатоцеллюлярной дегенерацией (скобка), некрозом одиночных клеток (*), увеличением количества синусоидных клеток, согласующимся с гиперплазией клеток Купфера и/или инфильтрацией лейкоцитов (#), повышенными показателями митоза (^), гиперплазией желчных протоков с фиброзом (+) и гепатоцеллюлярной вакуолизацией (стрелка). Совместное введение комплементарных REVERSIR™

обеспечивало снижение тяжести этих наблюдаемых признаков и часто ограничивало их распространения.

[0057] **фиг. 45** представляет собой столбчатые графики, на которых показаны эффекты соединений REVERSIR™ на активность в отношении RNAi в исследованиях токсичности на крысах. Нокдаун целевой mRNA в печени с помощью siRNA-1 и siRNA-5 оценивали при вскрытии (nx) с применением RT-qPCR в отношении целевой mRNA и нормализовали относительно конститутивной mRNA (18S rRNA) по сравнению с контрольной группой с солевым раствором. Целевые уровни белка в сыворотке крови с применением siRNA-4 оценивали при вскрытии с помощью ELISA относительно контрольной группы с солевым раствором. Q2d, введение дозы через день; qw, еженедельное введение дозы.

[0058] На **фиг. 46А-46Е** показано, что обмен затравочных областей уменьшает гепатотоксичность. На **фиг. 46А** показаны химические структуры затравочных областей при обмене между гепатотоксичной и негепатотоксичной GalNAc-siRNA. **фиг. 46В** представляет собой столбчатый график, на котором показаны показатели воздействия в печени для исходных и подвергнутых обмену затравочной области GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на крысах, оцененные с помощью RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS) при вскрытии (nx). **фиг. 46С** представляет собой столбчатый график, на котором показана загрузка RISC в печени, оцененная с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити при вскрытии. На **фиг. 46D** показаны уровни аланинаминотрансферазы (ALT) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного ANOVA в GraphPad Prism 7. ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. **фиг. 46Е** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. Токсичная siRNA характеризовалась гепатоцеллюлярной дегенерацией (скобка), некрозом одиночных клеток (*), увеличением количества синусоидных клеток, согласующимся с гиперплазией клеток Купфера

и/или инфильтрацией лейкоцитов (#), и гепатоцеллюлярной вакуолизацией (стрелка), при этом нетоксичная siRNA характеризовалась лишь минимальным уровнем вакуолизации. Наличие затравочной области из нетоксичной siRNA в осто́ве токсичной siRNA было сравнимо с полностью нетоксичной siRNA, а наличие затравочной области из токсичной siRNA в осто́ве нетоксичной siRNA характеризовалось некрозом одиночных клеток, увеличением количества синусоидных клеток и вакуолизацией, но при более низкой степени тяжести, чем в случае полноразмерного токсичного соединения.

[0059] На **фиг. 47А и 47В** показано, что нецелевые эффекты siRNA являются улучшенными в случае комплементарности затравочных областей *in vitro* и *in vivo*. **Фиг. 47А** представляет собой графики рассеяния для большого массива данных, на которых изображены глобальные изменения экспрессии генов в гепатоцитах крысы через 24 ч. после трансфекции 10 нМ GalNAc-siRNA с четырьмя различными последовательностями. **Фиг. 47В** представляет собой графики рассеяния для большого массива данных, на которых изображены глобальные изменения экспрессии генов в печени крысы через 24 ч. после подкожного введения GalNAc-siRNA при 50 мг/кг. Показаны две исходные GalNAc-siRNA и их RNAi-неактивные версии, блокированные с помощью инвертированных кэп-структур с удаленным азотистым основанием (iB). Синие точки, скорректированное р-значение $\leq 0,05$; красные точки, скорректированное р-значение $> 0,05$; N=3 животных/группа. Скорректированное р-значение для кратности изменения рассчитывали в DESeq2 с применением критерия Вальда с поправкой на множественность сравнений. р-Значение насыщения затравочной области рассчитывали с применением точного критерия Фишера. Дисперсия между группами, которые подвергали статистическому сравнению, была сходной.

[0060] На **фиг. 48А-48Г** показано, что спаривание оснований, опосредованное затравочной областью с дестабилизирующей модификацией, обеспечивает минимизацию нецелевых эффектов и уменьшение гепатотоксичности. На **фиг. 48А** показана нарушающая термостабильность модификация с помощью гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) в положении семь антисмысловой нити иллюстративной

токсичной siRNA-5. **фиг. 48В** представляет собой графики рассеяния для большого массива данных, на которых изображены глобальные изменения экспрессии генов в гепатоцитах крысы через 24 ч. после трансфекции 10 нМ исходных или GNA-модифицированных GalNAc-siRNA. N=3 технические повторности. **фиг. 48С** представляет собой столбчатый график, на котором показаны показатели воздействия в печени для исходной siRNA-5 и siRNA-5 с модифицированной затравочной областью в исследовании токсичности на крысах, оцененные с применением количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити (AS) при вскрытии (nx). **фиг. 48D** представляет собой столбчатый график, на котором показана загрузка RISC в печени, оцененная с применением RT-qPCR с применением структуры "петля на стебле" в отношении антисмысловой нити при вскрытии. На **фиг. 48Е** показаны уровни глутаматдегидрогеназы (GLDH) в сыворотке крови, измеренные при вскрытии. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного ANOVA в GraphPad Prism 7. ns, не значимо; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. **фиг. 48F** представляет собой изображения, на которых показано окрашивание с помощью H&E срезов печени, собранных при вскрытии. Токсичная исходная siRNA-5 характеризовалась фиброзом (круг), гепатоцеллюлярной дегенерацией (скобка), некрозом одиночных клеток (*), повышенными показателями митоза (^), увеличением количества синусоидных клеток, согласующимся с гиперплазией клеток Купфера и/или инфильтрацией лейкоцитов (#), и гепатоцеллюлярной вакуолизацией (стрелка), при этом нетоксичная siRNA характеризовалась лишь минимальным уровнем вакуолизации. siRNA-5 с GNA-модифицированной затравочной областью характеризовалась дегенерацией, некрозом одиночных клеток, повышенными показателями митоза и вакуолизацией, но при более низкой частоте возникновения и степени тяжести по сравнению с исходной siRNA-5. N=4 животных/группа; qw, еженедельное введение дозы; GNA, гликолевая нуклеиновая кислота.

[0061] На **фиг. 49А и 49В** показаны эффекты иллюстративных нарушающих термостабильность модификаций затравочных областей с помощью GNA в отношении целевой активности. **фиг. 49А** представляет собой столбчатый график, на котором показан нокдаун mRNA в гепатоцитах крыс, который оценивали через 24 ч. после трансфекции 10 нМ с применением количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) в отношении целевой mRNA и нормализовали относительно конститутивной mRNA (18S rRNA) по сравнению с ложной трансфекцией. **фиг. 49В** представляет собой столбчатый график, на котором показан нокдаун mRNA, который оценивали при вскрытии с применением RT-qPCR в отношении целевой mRNA и нормализовали относительно конститутивной mRNA (18S rRNA) по сравнению с контрольной группой с солевым раствором. Qw, еженедельное введение дозы; GNA, гликолевая нуклеиновая кислота.

[0062] На **фиг. 50 и 51** показаны кривые IC₅₀ иллюстративных dsRNA, нацеливающих на TTR (**фиг. 50**), и dsRNA, нацеливающих на фактор IX (F9) (**фиг. 51**), в гепатоцитах крысы (**фиг. 50**) и гепатоцитах мыши (**фиг. 51**).

[0063] На **фиг. 52 и 53** показано, что иллюстративные dsRNA по настоящему изобретению по отношению к TTR (**фиг. 52**) и F9 (**фиг. 53**) снижают эндогенные нецелевые эффекты. На **фиг. 52** показано специфическое в отношении положения понижение нецелевых эффектов для TTR-нацеливающих dsRNA *in vitro*. На **фиг. 53** показано специфическое в отношении положения понижение нецелевых эффектов для F9-нацеливающих dsRNA *in vitro*. Как можно увидеть, dsRNA в значительной степени обеспечивали уменьшение числа генов, которые подвергались понижающей или повышающей регуляции с помощью их соответствующих исходных dsRNA.

[0064] **фиг. 54** представляет собой линейные графики, на которых показан нокдаун целевого TTR с помощью иллюстративных dsRNA, содержащих нарушающие термостабильность модификации Mod 3, 6, 7 и 10. Как можно видеть, все модификации способны обеспечивать сохранение активности, подобной исходной.

[0065] **фиг. 55** представляет собой столбчатые графики, на которых показан нокдаун целевого GO1 с помощью иллюстративных dsRNA, содержащих нарушающие термостабильность модификации Mod

3, 5, 6, 7, 10 и 12. Как можно видеть, все модификации способны обеспечивать сохранение активности, подобной исходной.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0066] Авторы настоящего изобретения, среди прочего, открыли, что нецелевые эффекты молекул dsRNA могут быть снижены или подавлены путем встраивания нарушающих термостабильность нуклеотидов в некоторые положения в антисмысловой нити dsRNA. С этими нарушающими термостабильность модификациями в некоторых положениях в антисмысловой нити молекулы dsRNA были способны сохранять активность, направленную на сайленсинг генов, сходную с исходной dsRNA, при этом характеризуюсь пониженным нецелевым сайленсингом генов. Кроме того, число нецелевых генов, которые подвергаются понижающей регуляции или повышающей регуляции, также уменьшено с применением молекул dsRNA, содержащих такие нарушающие термостабильность модификации, по сравнению с исходной dsRNA.

[0067] В связи с этим, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство (dsRNA) для RNAi, способное к подавлению экспрессии целевого гена. В целом, молекулы dsRNA по настоящему изобретению демонстрируют высокий уровень целевого сайленсинга генов с понижением или минимизацией нецелевого сайленсинга генов и/или токсичности. Без ограничения молекулы dsRNA по настоящему изобретению могут быть заменены на молекулы dsRNA и могут применяться для РНК-интерференции на основе методик сайленсинга генов, включающих без ограничения пути применения *in vitro* или *in vivo*.

[0068] В общем, молекула dsRNA содержит смысловую нить (также называемую сопровождающей нитью) и антисмысловую нить (также называемую направляющей нитью). Длина каждой нити молекулы dsRNA может варьироваться от 12 до 40 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-40 нуклеотидов, 17-37 нуклеотидов, 25-37 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида. Без ограничений смысловая и

антисмысловая нити могут иметь одинаковую длину или неодинаковую длину.

[0069] В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет 18–35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет 21–25, 19–25, 19–21 или 21–23 нуклеотида. В некоторых конкретных вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет 23 нуклеотида. Аналогично антисмысловой нити, в некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити может составлять 18–35 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити составляет 21–25, 19–25, 19–21 или 21–23 нуклеотида. В некоторых конкретных вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет 21 нуклеотид.

[0070] Авторы настоящего изобретения также открыли, что для большей эффективности *in vivo* молекул dsRNA антисмысловая нить должна обладать некоторой метаболической стабильностью. Другими словами, для большей эффективности *in vivo* молекул dsRNA может быть необходимо присутствие *in vivo* некоторого количества антисмысловой нити после периода времени после введения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, антисмысловой нити dsRNA присутствует *in vivo*, например в печени мыши, на 5 день после введения *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, антисмысловой нити dsRNA присутствует *in vivo*, например в печени мыши, на 6 день после введения *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, антисмысловой нити dsRNA присутствует *in vivo*, например в печени мыши, на 7 день после введения *in vivo*. В некоторых вариантах

[illegible]

или по меньшей мере 80%, антисмысловой нити dsRNA присутствует *in vivo*, например в печени мыши, на 14 день после введения *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75% или по меньшей мере 80%, антисмысловой нити dsRNA присутствует *in vivo*, например в печени мыши, на 15 день после введения *in vivo*.

[0071] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), причем dsRNA характеризуется температурой плавления (T_m) от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; и (viii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0072] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в

пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA характеризуется значением T_m от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и vii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0073] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0074] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C (например, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C или 80°C). В некоторых вариантах осуществления

T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0075] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 5, 6, 7 или 8 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[0076] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 5 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[0077] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 6 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[0078] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 7 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[0079] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 8 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[0080] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и антисмысловая нить дополнительно предусматривает одну или обе из следующих характеристик:

2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтормодификаций и

1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; и

смысловая нить предусматривает одну, две или три из следующих характеристик:

- лиганд, конъюгированный со смысловой нитью;
- 2, 3, 4 или 5 2'-фтормодификаций и
- 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи.

В некоторых вариантах осуществления этого T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0081] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и лиганд конъюгирован со смысловой нитью, и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C.

[0082] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, причем лиганд конъюгирован со смысловой нитью, и dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0083] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, при этом антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при

этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, причем указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

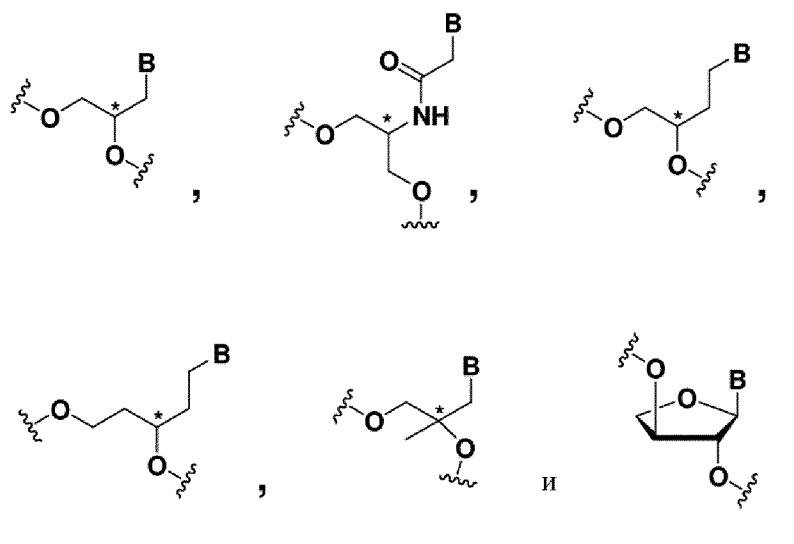
[0084] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4–8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0085] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом

указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом антисмысловая нить дополнительно предусматривает по меньшей мере две из следующих характеристик: (i) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 4–8 антисмысловой нити; (ii) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 (считая от 5'-конца); и антисмысловая нить имеет длину, составляющую от 18 до 35 нуклеотидов. В некоторых дополнительных вариантах осуществления лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0086] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и смысловая нить предусматривает по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) лиганд присоединен к каждому из концов смысловой нити; (ii) смысловая нить содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; и (iii) смысловая нить и антисмысловая нить характеризуются достаточной комплементарностью для образования двухнитевого участка, охватывающего по меньшей мере 19 нуклеотидных положений, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в пределах указанного двухнитевого участка. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

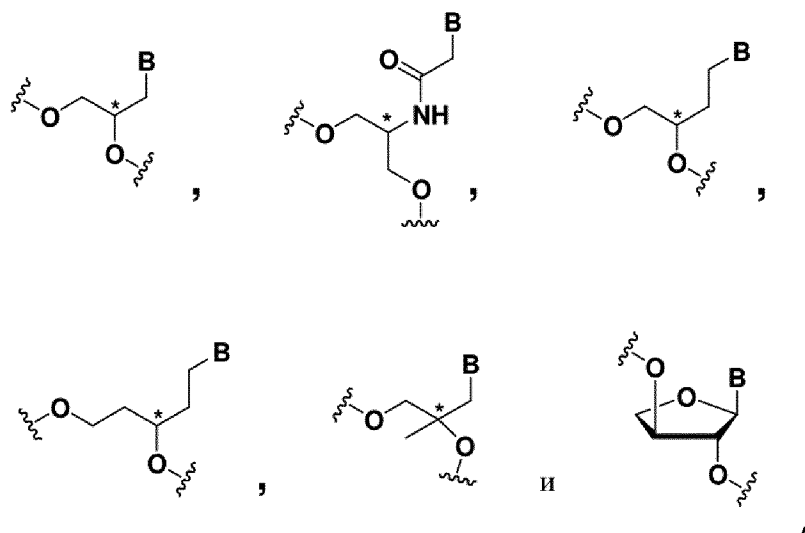
[0087] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую

термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4–8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

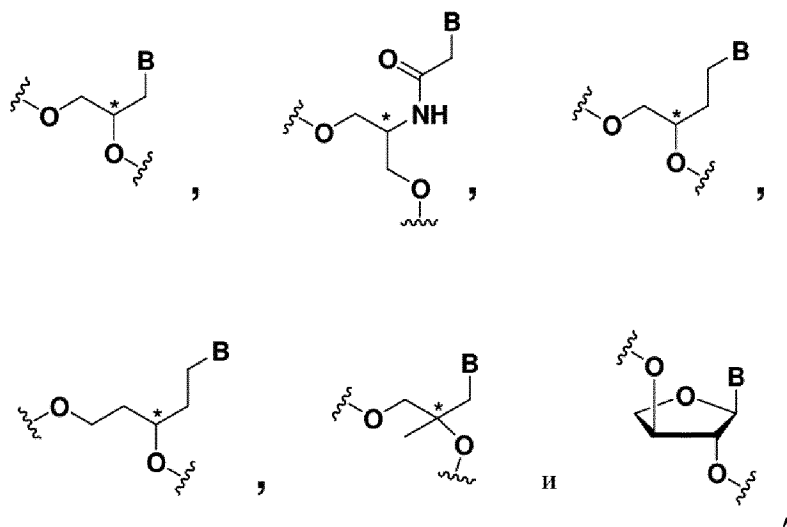


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0088] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, расположенную в положении 7, считая от 5'-конца антисмысловой нити, причем указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до

приблизительно 80°C. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0089] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 7, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

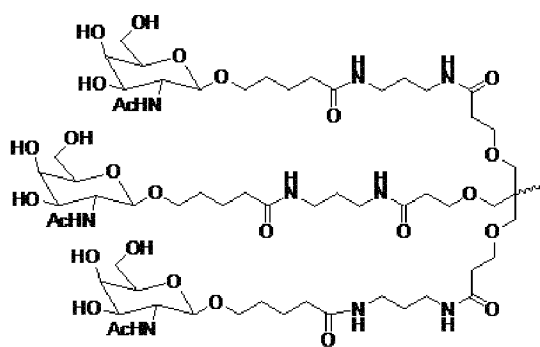


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0090] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить

содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом лиганд предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0091] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA необязательно характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом лиганд представляет собой лиганд ASGPR со структурой:



В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от

приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0092] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций и содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0093] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая

нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0094] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m ,

составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0095] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0096] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в

положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0097] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA

содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 24 пары нуклеотидов; и (viii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце смысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая нить имеет длину 19, 20, или 21, или 22 нуклеотида, и антисмысловая нить имеет длину 20, 21 или 22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0098] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от

приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[0099] В некоторых вариантах осуществления один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) и dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления "липкий" конец имеет длину 2, 3 или 4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00100] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA

характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или все шесть) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, и необязательно "липкий" конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00101] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может также иметь два тупых конца на обоих концах dsRNA-дуплекса.

[00102] В некоторых вариантах осуществления dsRNA предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-

модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00103] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, и предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или все шесть) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00104] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую нить, длина которой составляет 21 нуклеотид (нт), и антисмысловую нить, длина которой составляет 23 нуклеотида (нт), где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области

антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом один конец dsRNA является тупым, в то время как другой конец предусматривает "липкий" конец из 2 нт, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. Предпочтительно, "липкий" конец из 2 нт находится на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00105] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25–30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная от 5'-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1–23 указанной смысловой нити содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36–66 нуклеотидных остатков и, начиная от 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1–23 смысловой нити с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью, и не более 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым однонитевой 3'-"липкий" конец из 1–6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой нити содержит 10–30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя тем самым однонитевой 5'-"липкий" конец из 10–30 нуклеотидов; при этом по

меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, если смысловая и антисмысловая нити выровнены с обеспечением максимальной комплементарности, образуя тем самым практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид находится между положениями, являющимися противоположными или комплементарными положениям 14-17 5'-конца смысловой нити, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-30 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00106] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где указанная молекула dsRNA содержит смысловую нить с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29

нуклеотидов, и антисмысловую нить с длиной, которая составляет не более 30 нуклеотидов, при этом смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к ферментативному расщеплению, в положении 11 от 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой нити и 5'-конец указанной антисмысловой нити образуют тупой конец, и указанная антисмысловая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем смысловая нить, при этом длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нт по длине указанной антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной молекулы dsRNA в клетку млекопитающего, и при этом расщепление указанной dsRNA под действием Dicer предпочтительно приводит к siRNA, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой нити, вследствие чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-29 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00107] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00108] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить

содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00109] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00110] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; и (vii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления T_m , составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00111] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две,

три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик:

антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций;

антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей;

смысловая нить конъюгирована с лигандом;

смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций;

смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей;

dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации;

dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов, и

тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00112] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 7 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[00113] В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 9 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[00114] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и антисмысловая нить дополнительно предусматривает одну или обе из следующих характеристик:

2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтормодификаций и

1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и

смысловая нить предусматривает одну, две или три из следующих характеристик:

лиганд, конъюгированный со смысловой нитью;

2, 3, 4 или 5 2'-фтормодификаций и

1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

[00115] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и лиганд конъюгирован со смысловой нитью.

[00116] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, причем лиганд конъюгирован со смысловой нитью, и dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации.

[00117] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

[00118] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить

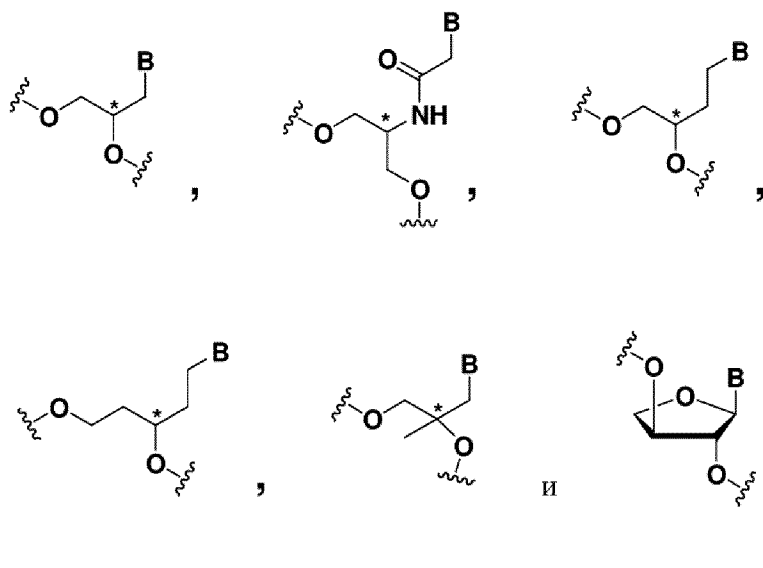
содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4-8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

[00119] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом антисмысловая нить дополнительно предусматривает по меньшей мере две из следующих характеристик: (i) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 4-8 антисмысловой нити; (ii) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 (считая от 5'-конца); и антисмысловая нить имеет длину, составляющую от 18 до 35 нуклеотидов. В некоторых дополнительных вариантах осуществления лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

[00120] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну

нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и смысловая нить предусматривает по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) лиганд присоединен к каждому из концов смысловой нити; (ii) смысловая нить содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; и (iii) смысловая нить и антисмысловая нить характеризуются достаточной комплементарностью для образования двухнитевого участка, охватывающего по меньшей мере 19 нуклеотидных положений, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в пределах указанного двухнитевого участка.

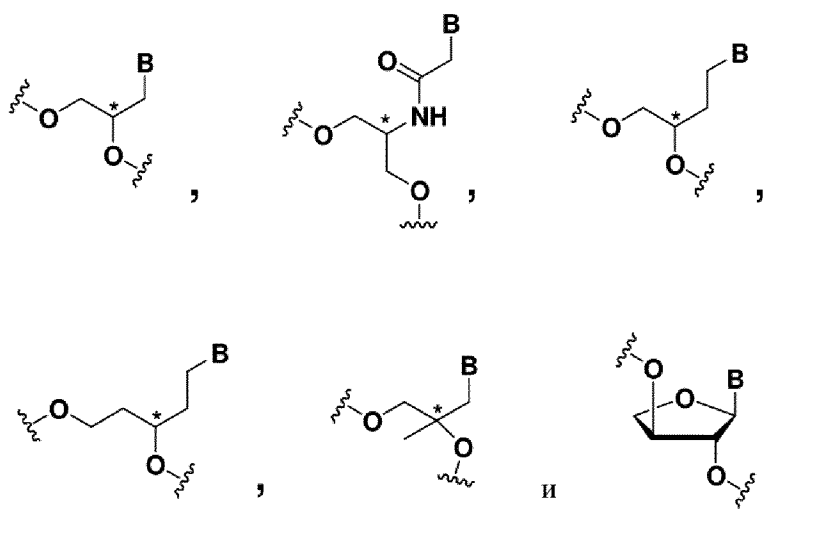
[00121] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



где В представляет собой модифицированное или

немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

[00122] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4–8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

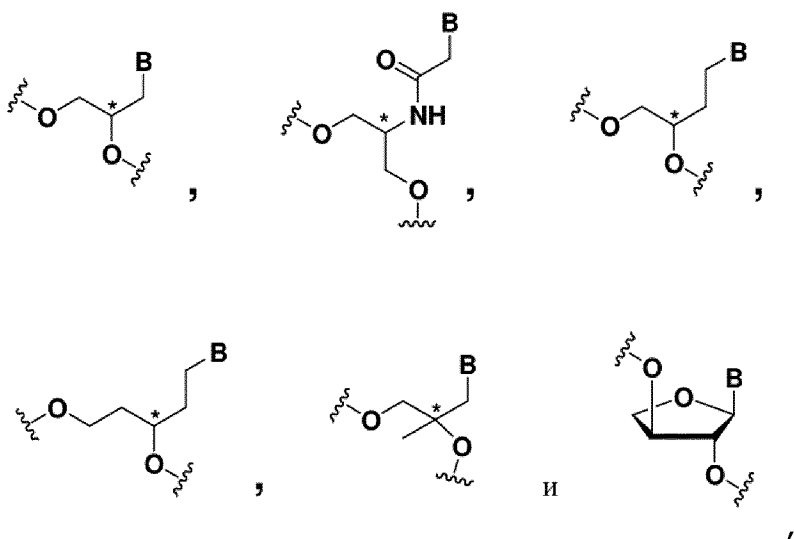


где *B* представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

[00123] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в

положении 7, считая от 5'-конца антисмысловой нити, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд.

[00124] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 7, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

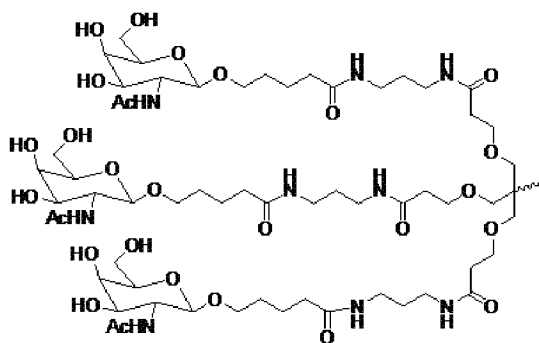


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

[00125] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну

нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, где лиганд предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

[00126] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом лиганд представляет собой лиганд ASGPR со структурой:



[00127] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и при этом dsRNA

необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00128] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00129] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 2'-

фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00130] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00131] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по

меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00132] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити) и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 или 16, или в положениях 2, 6, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22,

между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00133] В конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 10 и 11 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 6-8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00134] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 6, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00135] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00136] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 7 (считая от 5'-конца); где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00137] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца) и

(2) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 6 или 7 (считая от 5'-конца).

[00138] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) лигандом ASGPR, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(ii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(ii) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 6 или 7 (считая от 5'-конца).

[00139] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(ii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

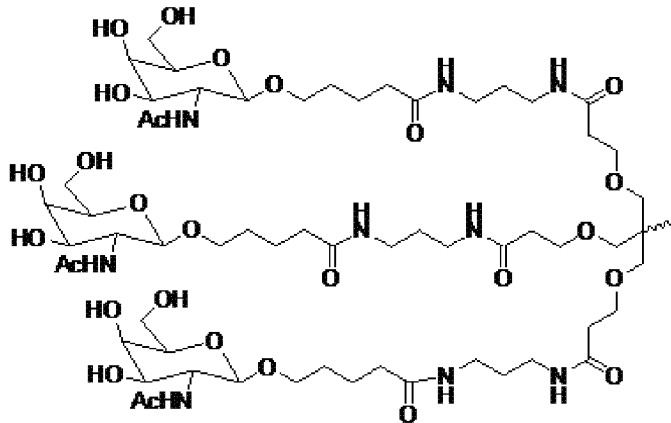
(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00140] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA дополнительно содержит по меньшей мере один лиганд ASGPR. Например, лиганд ASGPR предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, как например:



[00141] Согласно одному варианту осуществления лиганд ASGPR присоединен к 3-концу смысловой нити.

[00142] В некоторых случаях 2'-фтор-модификации в затравочной области антисмысловой нити, например в положениях 2-9, в частности положениях 3-9, могут иметь неблагоприятный эффект в отношении активности dsRNA *in vivo*, обладая при этом минимальным эффектом в отношении эффективности dsRNA *in vitro*. Авторы настоящего изобретения открыли, среди прочего, что активность *in vivo* таких dsRNA может быть восстановлена до

сравнимых уровней по сравнению с исходной dsRNA посредством удаления некоторых или всех из 2'-фтор-модификаций из затравочной области антисмысловой нити, т. е. в положении 2-9, в частности положении 3-9, считая от 5'-конца.

[00143] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все десять) из следующих характеристик: (i) температура плавления (T_m) составляет от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; (ii) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор-модификаций; (iii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iv) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (v) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (vi) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vii) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (viii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; (ix) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; (x) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций.

[00144] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить

содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или все десять) из следующих характеристик: (i) температура плавления (T_m) составляет от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; (ii) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор-модификаций; (iii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iv) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (v) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (vi) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vii) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (viii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; (ix) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (x) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и при этом в положениях 3–9 (считая от 5'-конца) антисмысловой нити отсутствует 2'-фтор-модификация.

[00145] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и антисмысловая нить дополнительно предусматривает одну или обе из следующих характеристик: (i) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор модификаций, где антисмысловая нить не содержит 2'-фтор-модификацию в положениях 3–9 (считая от 5'-конца); и (ii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и смысловая нить предусматривает одну, две, три или четыре из следующих характеристик: (i) лиганд, конъюгированный со смысловой нитью;

(ii) 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей и (iv) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00146] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и антисмысловая нить дополнительно предусматривает: (i) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор-модификаций и (ii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и смысловая нить предусматривает: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и при этом смысловая нить необязательно предусматривает одну, две или три из следующих характеристик: (i) лиганд, конъюгированный со смысловой нитью; (ii) 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей и (iv) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00147] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), при этом dsRNA характеризуется температурой

плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и антисмысловая нить дополнительно содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом антисмысловая нить необязательно содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор-модификаций; и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и при этом смысловая нить необязательно содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью, 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций и/или 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00148] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и антисмысловая нить дополнительно содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом антисмысловая нить необязательно содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 2'-фтор-модификаций, при условии, что в положениях 3–9 (считая с 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация; и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и при этом смысловая нить необязательно содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью, 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций и/или 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00149] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить

характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, причем лиганд конъюгирован со смысловой нитью, и dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация.

[00150] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00151] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4-8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом каждая из смысловой и

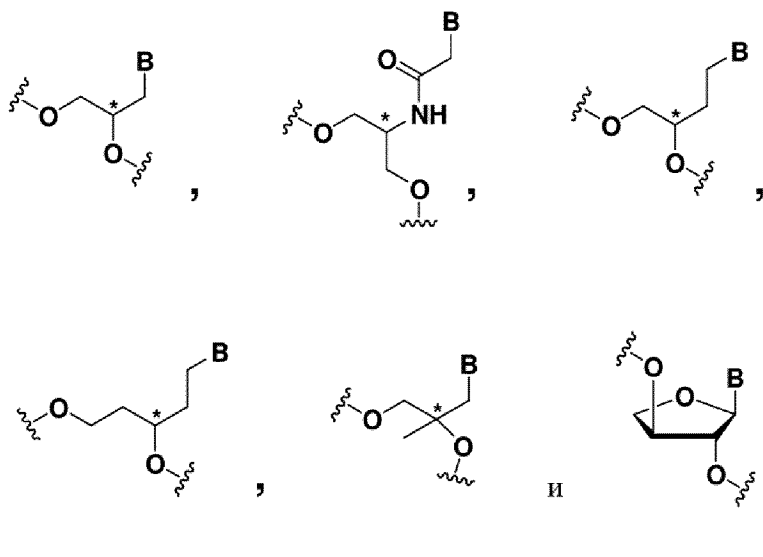
антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00152] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом антисмысловая нить дополнительно предусматривает по меньшей мере две из следующих характеристик: (i) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 4–8 антисмысловой нити; (ii) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 (считая от 5'-конца); и (iv) антисмысловая нить имеет длину, составляющую от 18 до 35 нуклеотидов, и при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых дополнительных вариантах осуществления лиганд представляет собой лиганд ASGPR. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00153] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и смысловая нить предусматривает по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) лиганд присоединен к каждому из концов смысловой нити; (ii) смысловая нить содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; (iii) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; и (iv) смысловая нить и антисмысловая нить проявляют достаточную комплементарность для образования двухнитевого участка, охватывающего по меньшей мере 19 нуклеотидных положений, при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в пределах указанного двухнитевого участка, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00154] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4-8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд и необязательно по меньшей мере одну LNA-модификацию, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой

нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

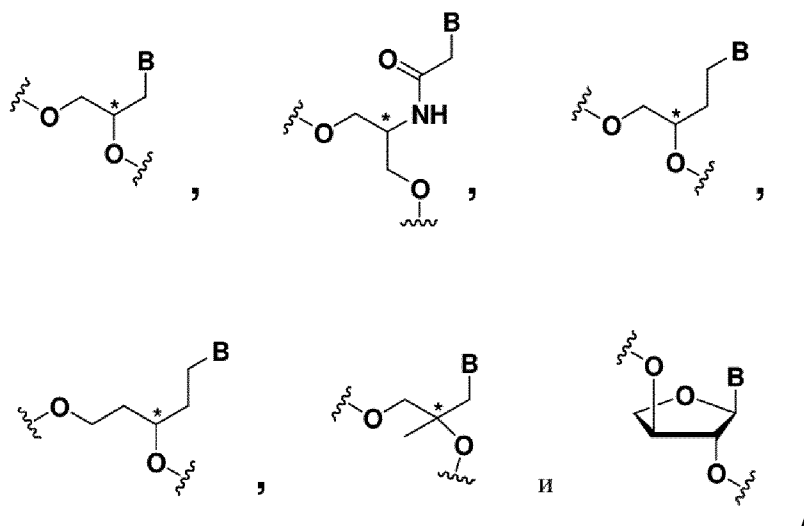


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00155] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, расположенную в положении 5, 6 или 7, считая от 5'-конца антисмысловой нити, при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация, где указанная смысловая нить содержит лиганд и необязательно по меньшей мере одну LNA-

модификацию, и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C.

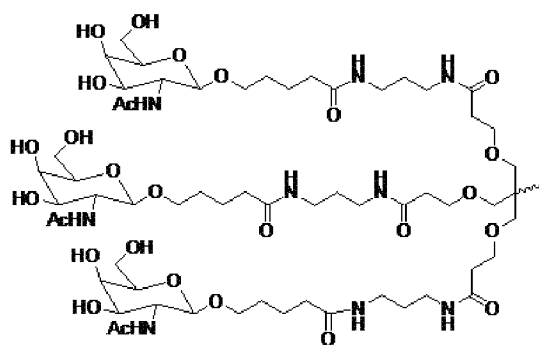
[00156] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 5, 6 или 7, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд и необязательно по меньшей мере одну LNA-модификацию, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00157] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд и необязательно по меньшей мере одну LNA-модификацию, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и где лиганд предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

[00158] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд и необязательно по меньшей мере одну LNA-модификацию, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и где лиганд представляет собой лиганд ASGPR со следующей структурой:



[00159] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом и необязательно содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; где антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, при условии, что в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая с 5'-конца) отсутствует 2'-модификация, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00160] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по

меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, и необязательно содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию; где антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, при условии, что в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-модификация, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00161] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи и необязательно содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положении 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными

положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00162] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию и необязательно содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления,

составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00163] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи, и необязательно содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00164] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-

модификации, содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи и содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00165] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 и необязательно содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при

этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00166] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификаций в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), содержит по меньшей мере одну LNA-модификацию и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00167] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, при условии, что в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 24 пары нуклеотидов; (viii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце смысловой нити; и (ix) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая нить имеет длину 19, 20, или 21, или 22 нуклеотида, и антисмысловая нить имеет длину 20, 21 или 22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00168] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид и 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи, и где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной

области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, при условии, что в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-модификация; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 24 пары нуклеотидов; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце смысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая нить имеет длину 19, 20, или 21, или 22 нуклеотида, и антисмысловая нить имеет длину 20, 21 или 22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00169] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2,

9, 14 или 16 или в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00170] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 9, 14 или 16 или в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере

одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00171] В некоторых вариантах осуществления один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления "липкий" конец имеет длину 2, 3 или 4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от

приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00172] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и необязательно "липкий" конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00173] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может также иметь два тупых конца на обоих концах dsRNA-дуплекса.

[00174] В некоторых вариантах осуществления dsRNA предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где

антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–40 пар нуклеотидов; и (viii) смысловая нить содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00175] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, и предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i)

антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) смысловая нить содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00176] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую нить, длина которой составляет 21 нуклеотид (нт), и антисмысловую нить, длина которой составляет 23 нуклеотида (нт), где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом один конец dsRNA является тупым, в то время как другой конец предусматривает "липкий" конец из 2 нт, при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит

тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. Предпочтительно, "липкий" конец из 2 нт находится на 3'-конце антисмысловой нити; и (viii) смысловая нить содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00177] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25–30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная от 5'-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1–23 указанной смысловой нити содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36–66 нуклеотидных остатков и, начиная от 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1–23 смысловой нити с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью, и не более 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым однонитевой 3'-"липкий" конец из 1–6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой нити содержит 10–30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя тем самым однонитевой 5'-"липкий" конец из 10–30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, если смысловая и антисмысловая нити выровнены с обеспечением максимальной комплементарности, образуя тем самым практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид

находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид находится между положениями, являющимися противоположными или комплементарными положениям 14–17 5'-конца смысловой нити, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–30 пар нуклеотидов; и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00178] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где указанная молекула dsRNA содержит смысловую нить с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую нить с длиной, которая составляет не более 30 нуклеотидов, при этом смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к ферментативному расщеплению, в положении 11 от 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой нити и 5'-конец указанной антисмысловой нити образуют тупой конец, и указанная антисмысловая нить на своем 3'-конце на 1–4 нуклеотида длиннее, чем смысловая нить, при этом длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная

антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нт по длине указанной антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной молекулы dsRNA в клетку млекопитающего, и при этом расщепление указанной dsRNA под действием Dicer предпочтительно приводит к siRNA, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой нити, вследствие чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–29 пар нуклеотидов; (viii) и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00179] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити

(т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 3 или 4 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–40 пар нуклеотидов; (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; (ix) и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00180] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii)

смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12-40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12-40 пар нуклеотидов; (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (ix) и смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00181] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12-40 пар нуклеотидов; (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (ix) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура

плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00182] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-фтор-модификация; (iv) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (viii) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00183] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает молекулу dsRNA, способную к подавлению экспрессии целевого гена, содержащую смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью, чтобы

опосредовать РНК-интерференцию, и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12–40 пар нуклеотидов; (viii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (ix) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00184] В некоторых конкретных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 5, 6 или 7 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 2, 3, 4, 8 или 9 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

[00185] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити,

считая от 5'-конца), и антисмысловая нить дополнительно предусматривает одну или обе из следующих характеристик: (i) 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3-9 (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация; и (ii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и при этом смысловая нить содержит одну, две, три или четыре из следующих характеристик: (i) лиганд, конъюгированный со смысловой нитью; (ii) 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iii) 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей и (iv) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций.

[00186] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, причем лиганд конъюгирован со смысловой нитью, и dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация.

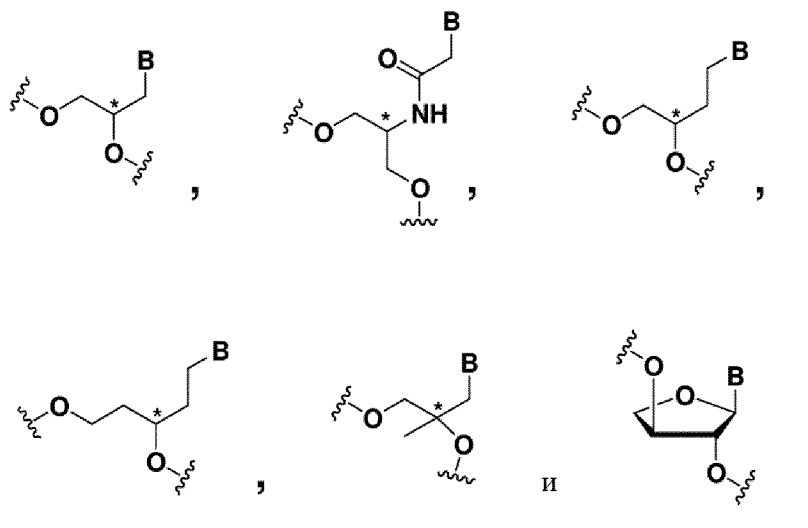
[00187] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

[00188] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4-8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация. В некоторых дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

[00189] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом антисмысловая нить дополнительно предусматривает по меньшей мере две из следующих характеристик: (i) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 4-8 антисмысловой нити; (ii) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, и при этом в положениях 3-9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация; (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 (считая от 5'-конца); и антисмысловая нить имеет длину, составляющую от 18 до 35 нуклеотидов. В некоторых дополнительных вариантах осуществления лиганд представляет собой лиганд ASGPR.

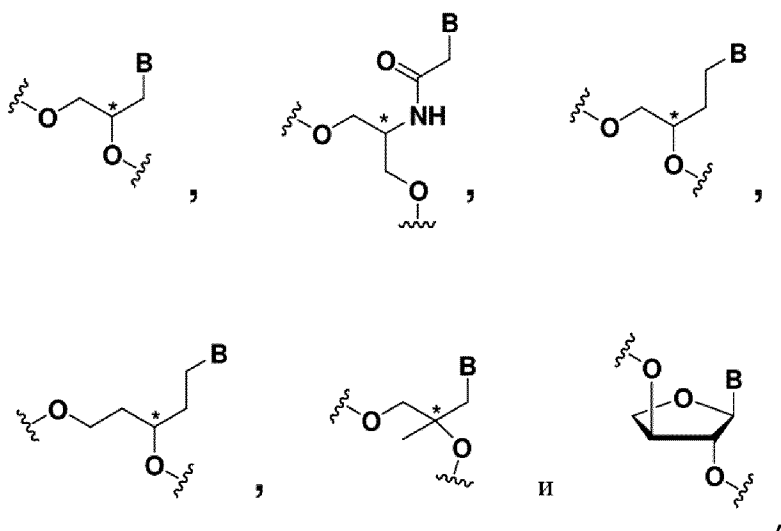
[00190] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и смысловая нить предусматривает по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) лиганд присоединен к каждому из концов смысловой нити; (ii) смысловая нить содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; (iii) смысловая нить и антисмысловая нить проявляют достаточную комплементарность для образования двухнитевого участка, охватывающего по меньшей мере 19 нуклеотидных положений; (iv) смысловая нить содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в пределах указанного двухнитевого участка, и при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация.

[00191] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо рацемический.

[00192] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 4–8, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, и где нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

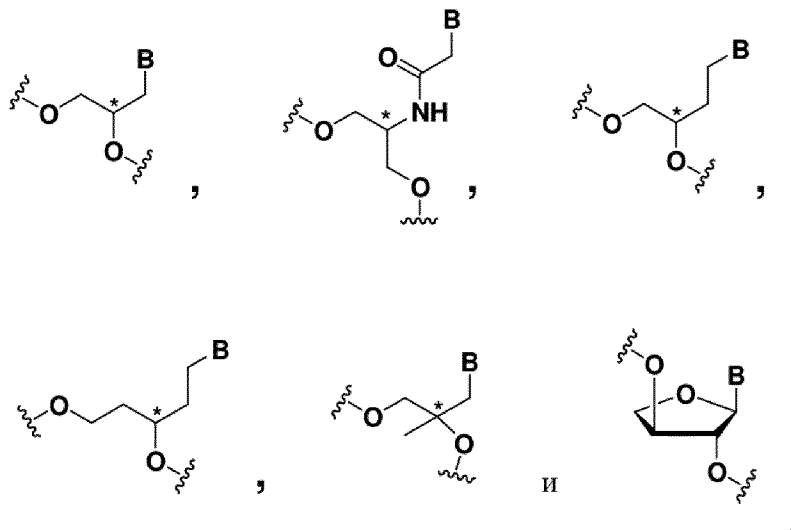


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо рацемический.

[00193] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 5, 6 или 7, считая от 5'-конца антисмысловой нити, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд.

[00194] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в положении 5, 6 или 7, считая от 5'-конца, при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, и при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-

модификации, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, и где нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

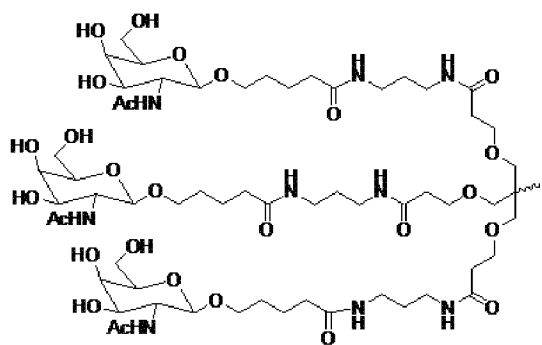


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

[00195] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, где лиганд предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

[00196] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить

характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, при этом dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор, при этом в положениях 3–9 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити) отсутствует 2'-модификация, при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, и при этом указанная смысловая нить содержит лиганд, где лиганд представляет собой лиганд ASGPR со структурой:



[00197] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); при этом смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; при этом антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, содержит 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00198] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций, где в положениях 3–9 антисмысловой нити отсутствует 2'-фтор-модификация, содержит 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00199] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 0 или 2 фосфотиоатные межнуклеотидные связи и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16, или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи

между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00200] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит 0 или 2 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16 или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00201] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить

конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16 или в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00202] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатных межнуклеотидных связей и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00203] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00204] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 3 или 4 2'-фтор-модификации, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и содержит 0, 1, 2 или 3 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными

положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00205] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00206] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид

находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), и содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00207] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две

или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00208] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 и 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00209] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в

положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00210] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 и необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну

(например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00211] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов; причем антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити); где смысловая нить конъюгирована с лигандом, содержит 2'-фтор-модификации в положениях 7, 10 и 11 или в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца смысловой нити), необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 LNA-модификаций и необязательно содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3; где антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модификации в положениях 2, 14 или 16; и антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, между нуклеотидными положениями 22 и 23, между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3; и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две или все три) из следующих характеристик: (i) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–25 пар нуклеотидов; (ii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (iii) dsRNA имеет "липкий" конец из по меньшей мере двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[00212] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую

термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), причем dsRNA характеризуется температурой плавления (T_m) от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; (viii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; (ix) при условии, что в положениях 3–9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00213] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах затравочной области (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити, считая от 5'-конца), и dsRNA характеризуется значением T_m от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по

меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и vii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити, при условии, что в положениях 3-9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00214] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, при условии, что в положениях 3-9 (считая от 5'-конца) отсутствует 2'-фтор-модификация. В некоторых вариантах осуществления температура плавления, составляющая от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C, является необязательной.

[00215] В конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 10 и 11 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00216] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00217] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00218] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) по меньшей мере одной (например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более) LNA-модификацией;

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00219] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и

(iv) по меньшей мере одной (например, одной, двумя или тремя) LNA-модификацией в положениях 1, 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00220] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца);

(iv) по меньшей мере одной (например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более) LNA-модификацией и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00221] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

- (a) смысловую нить, характеризующуюся:
 - (i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;
 - (ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая от 5'-конца) и
 - (iv) по меньшей мере одной (например, одной, двумя или тремя) LNA-модификацией в положениях 1, 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую нить, характеризующуюся:
 - (i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);
 - (iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и
 - (iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00222] В другом конкретном варианте осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению содержат:

- (a) смысловую нить, характеризующуюся:
 - (i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;
 - (ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 10 и 11 (считая

от 5'-конца);

(iv) по меньшей мере одной (например, одной, двумя или тремя) LNA-модификациями в положениях 1, 2 и 3 (считая от 5'-конца) и

(iv) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-F-модификациями в положениях 2, 14 и 16 (считая от 5'-конца);

(iii) фосфотиоатными межнуклеотидными связями между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца) и

(iv) нарушающей термостабильность модификацией дуплекса в положении 5, 6 или 7 (считая от 5'-конца);

где молекулы dsRNA имеют "липкий" конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00223]

[00224] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити независимо имеют длину 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-

модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 24 пары нуклеотидов; и (viii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце смысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления смысловая нить имеет длину 19, 20, или 21, или 22 нуклеотида, и антисмысловая нить имеет длину 20, 21 или 22 нуклеотида.

[00225] Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют дуплексную dsRNA. Длина дуплексного участка молекулы dsRNA может составлять 12-40 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-40 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 25-35 пар нуклеотидов, 27-35 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере длина дуплексного участка выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 пар нуклеотидов.

[00226] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по

меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления длина дуплексного участка составляет 18, 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидов. В конкретном варианте осуществления длина дуплексного участка составляет 21 пару нуклеотидов.

[00227] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит один или несколько выступающих участков и/или кэпирующих групп на 3'-конце или 5'-конце или обоих концах нити молекулы dsRNA. Длина "липкого" конца может составлять 1-10 нуклеотидов, 1-6 нуклеотидов, к примеру 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. "Липкие" концы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или результатом того, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. "Липкий" конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой mRNA, или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые происходит нацеливание, или он может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием "шпильки" или с помощью других не содержащих оснований линкеров.

[00228] В некоторых вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке молекулы dsRNA по настоящему изобретению независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, в том числе без ограничения с 2'-модификацией сахара, такой как, 2'-фтор 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин, 2'-O-метоксиэтиладенозин, 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин, GNA, SNA, hGNA, hhGNA, mGNA, TNA, h'GNA и любые их комбинации. Например, последовательность "липкого" конца на любом конце любой нити может быть ТТ. "Липкий" конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой mRNA, или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые происходит нацеливание, или он может иметь другую последовательность.

[00229] 5'- или 3'-"липкие" концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей молекулы dsRNA могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий участок содержит два нуклеотида с фосфотиоатной связью между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-"липкий" конец присутствует в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-"липкий" конец присутствует в смысловой нити.

[00230] Молекула dsRNA по настоящему изобретению может содержать только один "липкий" конец, который может усиливать активность интерференции у dsRNA без воздействия на ее общую стабильность. Например, одонитевой "липкий" конец расположен на 3'-терминальном конце смысловой нити или, в качестве альтернативы, на 3'-терминальном конце антисмысловой нити. dsRNA также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити), или наоборот. Как правило, антисмысловая нить dsRNA имеет "липкий" конец из нуклеотидов на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступ антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC. Например, длина одного "липкого" конца составляет по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dsRNA имеет "липкий" конец из 2 нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00231] В некоторых вариантах осуществления один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т.

е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) и dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых конкретных вариантах осуществления "липкий" конец имеет длину 2, 3 или 4 нуклеотида.

[00232] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или все шесть) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации, и необязательно "липкий" конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах

осуществления "липкий" конец находится на 3'-конце антисмысловой нити, а тупой конец находится на 5'-конце антисмысловой нити.

[00233] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может также иметь два тупых конца на обоих концах dsRNA-дуплекса.

[00234] В некоторых вариантах осуществления dsRNA предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, и при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов.

[00235] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидных оснований, и предусматривает тупой конец на обоих концах дуплекса, где один конец dsRNA представляет собой тупой конец, а другой конец предусматривает "липкий" конец, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или все шесть) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит

1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации.

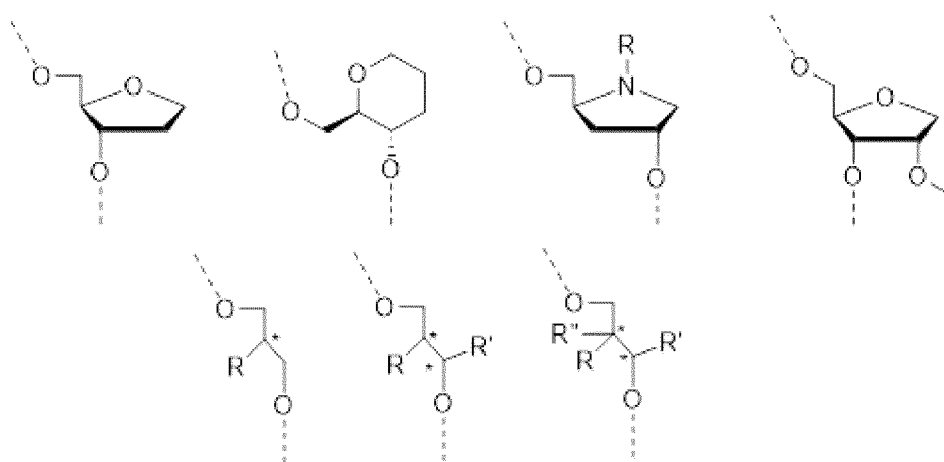
Нарушающие термостабильность модификации

[00236] Как указано выше, молекула dsRNA может быть оптимизирована для РНК-интерференции путем введения нарушающих термостабильность модификаций в затравочную область антисмысловой нити (т. е. в положения 2–9 5'-конца антисмысловой нити) для уменьшения или подавления нецелевого сайленсинга генов. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что dsRNA с антисмысловой нитью, содержащей по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, антисмысловой нити, обладают пониженной нецелевой активностью в отношении сайленсинга генов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-участка антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положениях 2–9, или предпочтительно положениях 4–8, от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых дополнительных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой нити. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положении 7 от 5'-конца антисмысловой нити. Термин "нарушающая(-ие) термостабильность модификация(-ии)" включает модификацию(-ии), приводящую(-ие) в результате к dsRNA с более низкой общей температурой плавления (T_m) (предпочтительно T_m на один, два, три или четыре градуса ниже, чем T_m dsRNA, не имеющей такой(-их) модификации(-ий)). В некоторых вариантах осуществления нарушающая

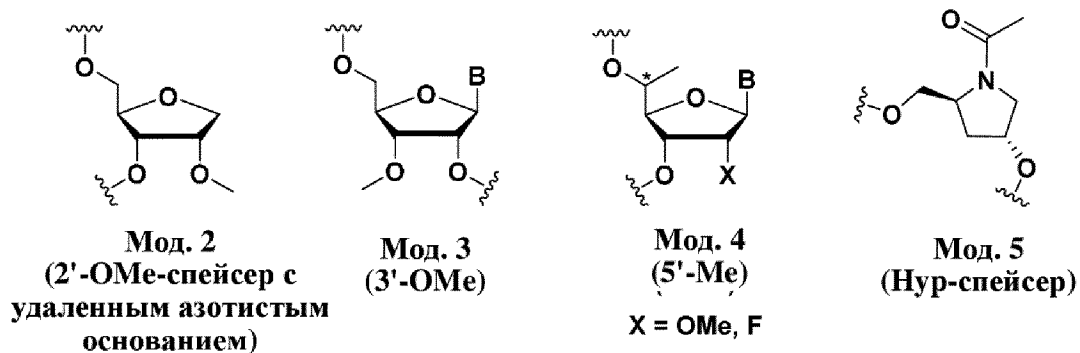
термостабильность модификация дуплекса находится в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой нити.

[00237] Нарушающие термостабильность модификации могут включать без ограничения модификацию с удалением азотистого основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом противоположной цепи и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксимо модификация или ациклический нуклеотид, например незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

[00238] Иллюстративные модификации с удалением азотистого основания включают без ограничения следующее:

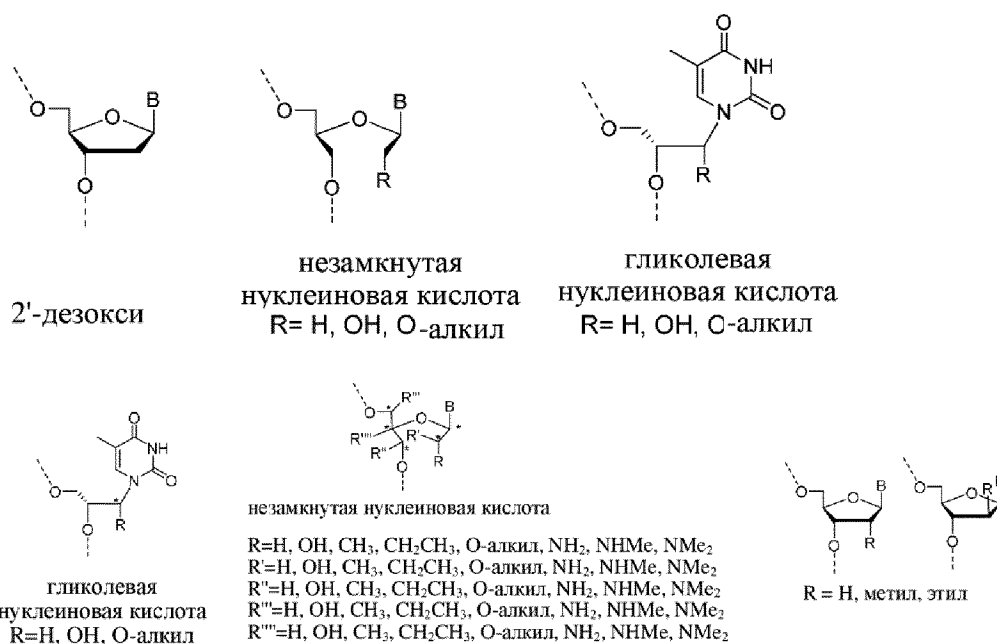


где $R = \text{H, Me, Et или OMe}$; $R' = \text{H, Me, Et или OMe}$; $R'' = \text{H, Me, Et или OMe}$,



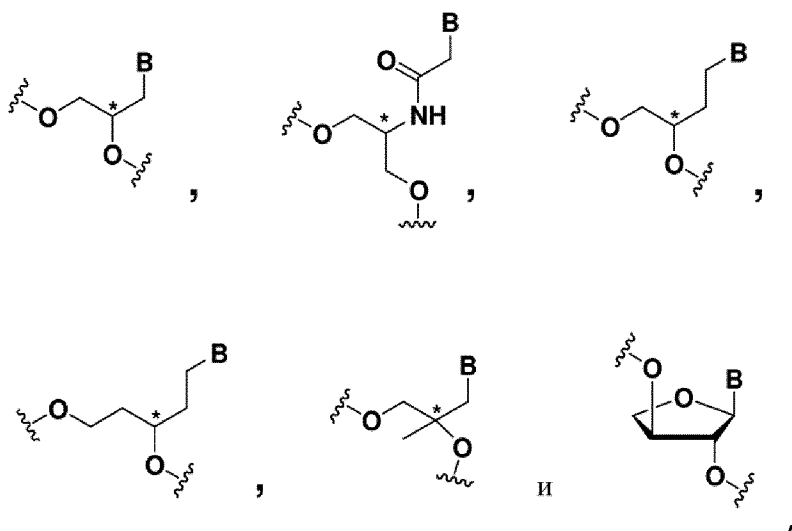
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

[00239] Иллюстративные модификации сахара включают без ограничения следующее:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

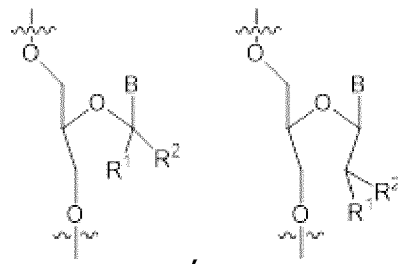
[00240] В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



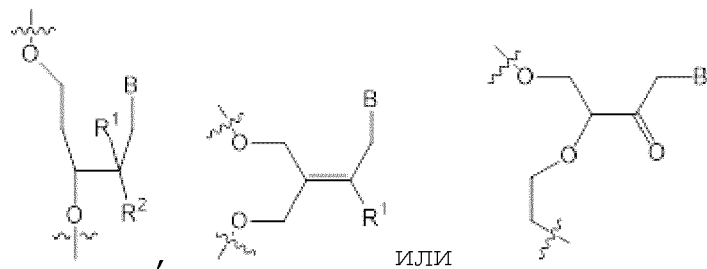
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, *S*, либо *рацемический*.

[00241] Термин "ациклический нуклеотид" относится к любому нуклеотиду с ациклическим рибозным сахаром, например, в котором любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует и/или в

нуклеотиде отсутствует по меньшей мере один из атомов углерода или атом кислорода рибозы (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления



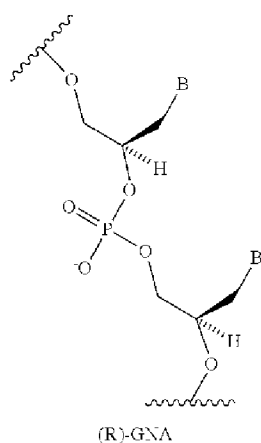
ациклический нуклеотид представляет собой



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R¹ и R² независимо представляют собой H, галоген, OR₃ или алкил; и R₃ представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Термин "UNA" относится к незапертой ациклической нуклеиновой кислоте, в которой какая-либо из связей в сахаре была удалена с образованием незапертого "сахарного" остатка. Согласно одному примеру UNA также охватывает мономеры, у которых удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). Согласно другому примеру связь C2'-C3' (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') в сахаре удалена (см. Mikhailov et. al., Tetrahedron Letters, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 10: 1039 (2009), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не оказывая влияние на спаривание оснований по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством связи 2'-5' или 3'-5'.

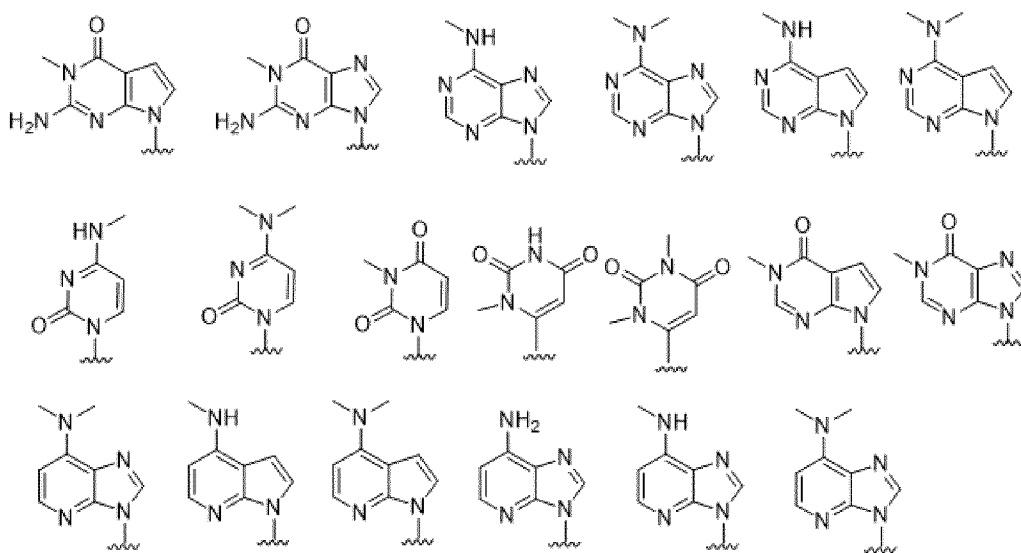
[00242] Термин 'GNA' относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся от них составом своего "остова", поскольку

его составляют повторяющиеся единицы глицерина, соединенные фосфодиэфирными связями:



[00243] Нарушающая термостабильность модификация дуплекса может представлять собой ошибочные спаривания (т. е. некомплементарные пары оснований) между нарушающим термостабильность нуклеотидом и противоположным нуклеотидом противоположной нити dsRNA-дуплекса. Иллюстративные ошибочно спаренные пары оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинацию. Другие типы ошибочного спаривания оснований, известные из уровня техники, также применимы в настоящем изобретении. Может встречаться ошибочное спаривание между нуклеотидами, которые представляют собой как встречающиеся в природе нуклеотиды, так и нуклеотиды с модификацией, т. е. может встречаться ошибочное спаривание оснований у нуклеиновых оснований соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций, присутствующих на рибозных сахарах нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления молекула dsRNA содержит по меньшей мере одно ошибочно спаренное нуклеиновое основание, то есть 2'-дезоксирибонуклеиновое основание; например 2'-дезоксирибонуклеиновое основание в смысловой нити.

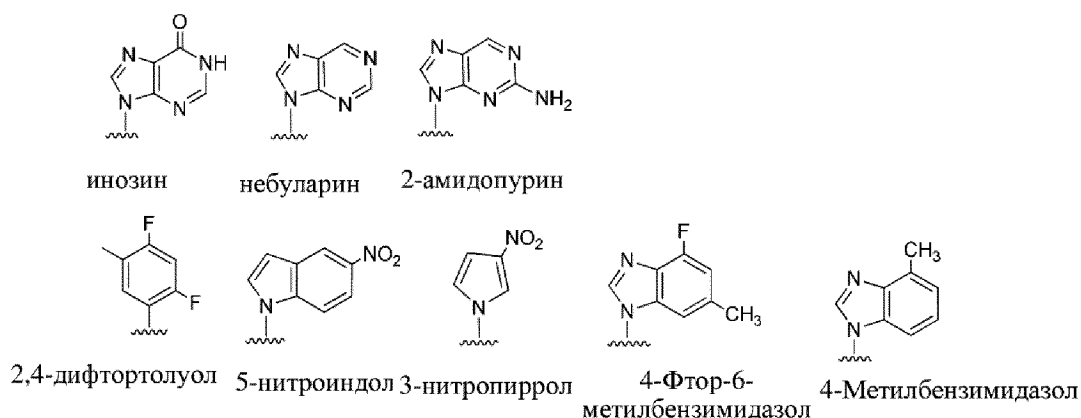
[00244] В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой нити включает нуклеотиды с ослабленной способностью к образованию Н-связей по W-C с комплементарным основанием целевой mRNA, такие как:



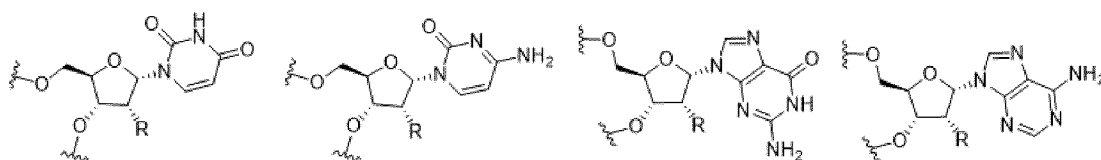
[00245] Больше число примеров нуклеотидов с удаленным азотистым основанием, модификаций в виде ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций, представляющих собой ошибочное спаривание, описано подробно в документе WO 2011/133876, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00246] Нарушающие термостабильность модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями противоположной нити, а также фосфатные модификации.

[00247] В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как без ограничения модификации нуклеиновых оснований с ослабленной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной нити. Такие модификации нуклеиновых оснований были исследованы в отношении дестабилизации центрального участка dsRNA-дуплекса, как описано в WO 2010/0011895, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:

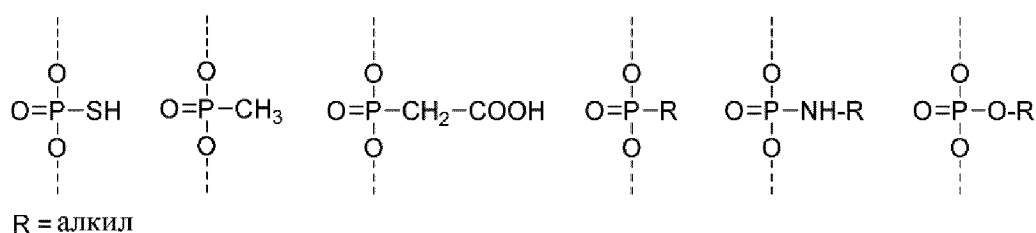


[00248] В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой нити включает один или несколько α -нуклеотидов, комплементарных основанию в целевой mRNA, таких как:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

[00249] Иллюстративные фосфатные модификации, которые, как известно, снижают термостабильность dsRNA-дуплексов по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, представляют собой:



[00250] Алкил для группы R может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают без ограничения метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

[00251] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные дестабилизирующие модификации показаны на фиг. 1.

[00252] В дополнение к антисмысловой нити, содержащей нарушающую термостабильность модификацию, dsRNA также может содержать одну или несколько стабилизирующих модификаций. Например, dsRNA может содержать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или

более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений все стабилизирующие модификации могут находиться в одной нити. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая нити содержат по меньшей мере две стабилизирующих модификации. Стабилизирующая модификация может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити. Например, стабилизирующая модификация может встречаться у каждого нуклеотида в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая стабилизирующая модификация может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или же смысловая нить или антисмысловая нить содержит обе стабилизирующие модификации в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна стабилизирующих модификаций в антисмысловой нити.

[00253] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений стабилизирующая модификация в антисмысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

[00254] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, которая расположена рядом с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующая модификация может представлять собой нуклеотид при 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения

дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующую модификацию при каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 относительно положения дестабилизирующей модификации.

[00255] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере две стабилизирующих модификации при 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения дестабилизирующей модификации.

[00256] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений стабилизирующая модификация в смысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12 и 15 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

[00257] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить не содержит стабилизирующую модификацию в положении, являющемся противоположным или комплементарным нарушающей термостабильность модификации дуплекса в антисмысловой нити.

[00258] Иллюстративные повышающие термостабильность модификации включают без ограничения 2'-фтор-модификации. Другие повышающие термостабильность модификации включают без ограничения LNA.

[00259] В некоторых вариантах осуществления dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений все 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды могут находиться в одной нити. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая нити содержат по меньшей мере два 2'-фтор-модифицированных нуклеотида. 2'-Фтор-модификация может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити. Например, 2'-фтор-модификация может встречаться у каждого нуклеотида в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая 2'-фтор-модификация может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или же смысловая нить или антисмысловая нить содержит обе 2'-фтор-модификации в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн 2'-фтор-модификаций в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн 2'-фтор-модификаций в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна 2'-фтор-модификаций в антисмысловой нити.

[00260] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере два (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений 2'-фтор-модификация в антисмысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

[00261] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере один 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, который расположен рядом с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фтор-модифицированным нуклеотидом

может являться нуклеотид при 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированный нуклеотид при каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 относительно положения дестабилизирующей модификации.

[00262] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере два 2'-фтор-модифицированных нуклеотида на 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения дестабилизирующей модификации.

[00263] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений 2'-фтор-модификация в смысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12 и 15 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой нити, считая от 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит блок из двух, трех или четырех 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

[00264] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить не содержит 2'-фтор-модифицированный нуклеотид в положении, являющемся противоположным или комплементарным нарушающей термостабильность модификации дуплекса в антисмысловой нити.

[00265] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую нить, длина которой составляет 21 нуклеотид (нт), и антисмысловую нить, длина которой составляет 23 нуклеотида (нт), где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), при этом один конец dsRNA является тупым, в то время как другой конец предусматривает "липкий" конец из 2 нт, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. Предпочтительно, "липкий" конец из 2 нт находится на 3'-конце антисмысловой нити.

[00266] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная от 5'-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1-23 указанной смысловой нити содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная от 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью, и не более 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым одонитевой 3'-"липкий" конец из 1-6 нуклеотидов; при

этом 5'-конец антисмысловой нити содержит 10–30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя тем самым однонитевой 5'-"липкий" конец из 10–30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, если смысловая и антисмысловая нити выровнены с обеспечением максимальной комплементарности, образуя тем самым практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2–9 5'-конца антисмысловой нити), например нарушающий термостабильность нуклеотид находится между положениями, являющимися противоположными или комплементарными положениям 14–17 5'-конца смысловой нити, и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12–30 пар нуклеотидов.

[00267] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где указанная молекула dsRNA содержит смысловую нить с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую нить с длиной которая составляет не

более 30 нуклеотидов, при этом смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к ферментативному расщеплению, в положении 11 от 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой нити и 5'-конец указанной антисмысловой нити образуют тупой конец, и указанная антисмысловая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем смысловая нить, при этом длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нт по длине указанной антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной молекулы dsRNA в клетку млекопитающего, и при этом расщепление указанной dsRNA под действием Dicer предпочтительно приводит к siRNA, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой нити, вследствие чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-29 пар нуклеотидов.

[00268] В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити молекулы dsRNA может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицированным с помощью одинаковой или отличной модификации, которая может включать одно или несколько изменений одного или

обоих не связанных с фосфатом атомов кислорода и/или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфорилированными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

[00269] Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера модификация может встречаться только в 3'-или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухнитевом участке, в одонитевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в одонитевом участке РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в положении не образующего связь атома О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухнитевом и одонитевом участках, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

[00270] Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в "липкие" концы или для включения нуклеотидов с модификациями или имитаторов нуклеотидов в одонитевые "липкие" концы, например в 5'-или 3'-"липкий" конец или в оба. Например, может быть желательно включать в "липкие" концы пуриновые нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'-или 5'-"липком" конце могут быть модифицированы, например

с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут предусматривать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с помощью модификаций, известных из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F) - или 2'-О-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификаций фосфатной группы, например, фосфоротиоатных модификаций. "Липкие" концы не обязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

[00271] В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксидезокси или 2'-фтора. Нити могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора. Следует понимать, что такие модификации являются дополнительными к по меньшей мере одной нарушающей термостабильность модификации дуплекса, присутствующей в антисмысловой нити.

[00272] По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут представлять собой 2'-дезоксидезокси, 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити содержит два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метила или 2'-дезоксидезокси. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток в смысловой нити и в антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метилнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксидезокси-2'-фторнуклеотида, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA)-нуклеотида, 2'-О-диметиламиноэтоксипропила (2'-О-DMAEOE)-нуклеотида, 2'-О-аминопропила (2'-О-AP)-нуклеотида или 2'-ара-Ф-нуклеотида. Опять же, следует понимать, что такие модификации являются дополнительными к по меньшей мере одной нарушающей термостабильность модификации дуплекса, присутствующей в антисмысловой нити.

[00273] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит модификации в виде чередующегося паттерна, в частности в участках B1, B2, B3, B1', B2', B3', B4'. Термин "чередующийся мотив" или "чередующийся паттерн", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается в чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABV...", "AABAABAABAAB...", "AAABAABAABAAB...", "AAABVBAABV..." или "ABCABCABCABC..." и т. д.

[00274] Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая смысловая нить или антисмысловая нить может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, как, например, "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." или "CDCDCD..." и т. д.

[00275] В некоторых вариантах осуществления для молекулы dsRNA по настоящему изобретению предусмотрено, что паттерн модификаций для чередующегося мотива в смысловой нити сдвинут относительно паттерна модификаций для чередующегося мотива в антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной иным способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и наоборот. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в dsRNA-дуплексе чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ABABAB" в направлении от 5'-к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "BABABA" в направлении от 3'-к 5'-концу нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "AABBAABV" в направлении от 5'-к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в

антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" в направлении от 3'- к 5'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

[00276] Молекула dsRNA по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться в любом нуклеотиде смысловой нити, или антисмысловой нити, или обеих нитей в любом положении нити. К примеру, модификация межнуклеотидной связи может встречаться в каждом нуклеотиде в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить содержит обе модификации межнуклеотидной связи в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити.

[00277] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок содержит два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидных связей также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за

выступающим нуклеотидом. Например, может присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Предпочтительно эти три концевые нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой нити.

[00278] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить молекулы dsRNA содержит 1-10 блоков из от двух до десяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая нить спарена с антисмысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00279] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00280] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из трех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом

положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00281] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из четырех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00282] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00283] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из шести фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с

антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00284] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из семи фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00285] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из восьми фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00286] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из девяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

[00287] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или несколько модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах 1–10 концевых положений смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или обоих концах смысловой и/или антисмысловой нити.

[00288] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или несколько модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах 1–10 остатков внутреннего участка дуплекса каждой из смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть соединены посредством фосфотиоатной метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8–16 дуплексного участка, считая от 5'-конца смысловой нити; при этом молекула dsRNA необязательно может дополнительно содержать одну или несколько модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах 1–10 концевых положений.

[00289] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и от одной до пяти модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и от одной до пяти модификаций фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00290] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 1–5 и одну модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–

23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00291] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00292] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00293] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00294] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 1–5 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной

связи в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00295] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 1–5 и одну в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00296] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 1–5 (считая от 5'-конца) смысловой нити и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00297] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 1–5 (считая от 5'-конца) смысловой нити и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00298] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и одну в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00299] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00300] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 1–5 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в пределах положений 18–23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в пределах положений 18–23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00301] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 20 и 21 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00302] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 20 и 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00303] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две

модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 21 и 22 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00304] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 21 и 22 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00305] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 22 и 23 смысловой нити (считая от 5'-конца) и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00306] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфотиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца) и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две модификации фосфотиоатных межнуклеотидных связей в положениях 23 и 23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

[00307] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению предусматривает паттерн хиральных центров остова. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 6 межнуклеотидных связей в Sp-

[illegible]

[illegible]

являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает не более 1 межнуклеотидной связи, которая не является хиральной. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова предусматривает по меньшей мере 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Rp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи, которые не являются хиральными, необязательно являются смежными или несмежными.

[00308] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению предусматривает блок, который

представляет собой стереохимический блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Rp-блок, в котором каждая межнуклеотидная связь блока является Rp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая межнуклеотидная связь блока является Sp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат как Rp-, так и Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или несколько Rp-блоков, но не содержат Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или несколько Sp-блоков, но не содержат Rp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или несколько PO-блоков, где каждая межнуклеотидная связь в виде природной фосфатной связи.

[00309] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит 5'-блок, который представляет собой Sp-блок, где каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждый сахарный фрагмент

содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных единиц.

[00310] В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению предусматривает тип нуклеозида в области или олигонуклеотиде, которому соответствует конкретный тип межнуклеотидной связи, например природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, хиральная межнуклеотидная Rp-связь, хиральная межнуклеотидная Sp-связь и т. д. В некоторых вариантах осуществления A соответствует Sp. В некоторых вариантах осуществления A соответствует Rp. В некоторых вариантах осуществления A соответствует природной фосфатной связи (PO). В некоторых вариантах осуществления U соответствует Sp. В некоторых вариантах осуществления U соответствует Rp. В некоторых вариантах осуществления U соответствует природной фосфатной связи (PO). В некоторых вариантах осуществления C соответствует Sp. В некоторых вариантах осуществления C соответствует Rp. В некоторых вариантах осуществления C соответствует природной фосфатной связи (PO). В некоторых вариантах осуществления G соответствует Sp. В некоторых вариантах осуществления G соответствует Rp. В некоторых вариантах осуществления G соответствует природной фосфатной связи (PO). В некоторых вариантах осуществления C и U соответствуют Sp. В некоторых вариантах осуществления C и U соответствуют Rp. В некоторых вариантах осуществления C и U соответствуют природной фосфатной связи (PO). В некоторых

вариантах осуществления А и G соответствуют Sp. В некоторых вариантах осуществления А и G соответствуют Rp.

[00311] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00312] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv)

смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00313] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00314] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса, находящуюся в затравочной области антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой

нити), и при этом dsRNA необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной, составляющей 12-40 пар нуклеотидов; и (vii) dsRNA предусматривает тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[00315] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит ошибку(-и) спаривания с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, исходя из свободной энергии ассоциации или диссоциации для конкретного спаривания, при этом наиболее простым подходом является исследование пар по отдельности для каждой пары, хотя также можно применять анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других местах данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

[00316] В некоторых вариантах осуществления для молекулы dsRNA по настоящему изобретению предусмотрено, что по меньшей мере одна из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований от 5'-конца в пределах дуплексных участков антисмысловой нити может быть независимо выбрана из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических или отличных от канонических типов спаривания или типов спаривания, которые

включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

[00317] В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 от 5'-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU.

[00318] Авторы настоящего изобретения установили, что введение нуклеотида с 4'-модификацией и/или 5'-модификацией в 3'-конец фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) и/или фосфородитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении однонитевого или двухнитевого олигонуклеотида может оказывать стерический эффект на межнуклеотидную связь и, следовательно, защитить ее от действия нуклеаз или сделать устойчивой к ним.

[00319] В некоторых вариантах осуществления 5'-модифицированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. К примеру, 5'-алкилированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в положении 5' рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым R- или S-изомером.

[00320] В некоторых вариантах осуществления 4'-модифицированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. К примеру, 4'-алкилированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в положении 4' рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид.

4'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. В качестве альтернативы 4'-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен в 3'-конец динуклеотида в любое положение однонитевой или двухнитевой siRNA. 4'-*O*-алкил рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

[00321] В некоторых вариантах осуществления 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 5'-Алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

[00322] В некоторых вариантах осуществления 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 4'-алкил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

[00323] В некоторых вариантах осуществления 4'-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 5'-Алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

[00324] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может содержать 2'-5' связи (с 2'-H, 2'-OH и 2'-OMe, а также с P=O или P=S). Например, модификации 2'-5' связей можно использовать для содействия устойчивости к

нуклеазам или для подавления связывания смысловой и антисмысловой нитей, или их можно использовать на 5'-конце смысловой нити для предупреждения активации смысловой нити под действием RISC.

[00325] В другом варианте осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-OH и 2'-OMe). Например, такие модификации L-сахаров можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой с антисмысловой нитью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой нити для предупреждения активации смысловой нити под действием RISC.

[00326] В различных публикациях описаны мультимерные siRNA, причем всех их можно применять в случае dsRNA по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[00327] В случае молекулы dsRNA, которая содержит один или несколько углеводных фрагментов, конъюгированных с молекулой dsRNA, может улучшаться одно или несколько свойств молекулы dsRNA. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице молекулы dsRNA. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц молекулы dsRNA можно замещать другим фрагментом, например неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был замещен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замещения рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т. е. один или несколько атомов в кольце могут представлять собой гетероатом, например, атом азота, кислорода, серы. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или

более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую системой или он может содержать одну или несколько двойных связей.

[00328] Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Выражение "точка присоединения к остову", используемое в данном документе, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или в целом к связи, предусмотренной для введения носителя в остов и которая подходит для этого, например, к фосфату или модифицированному фосфату, например, серосодержащей остовной связи рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в кольцо атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно, выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или в целом обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, с атомом, входящим в состав кольца.

[00329] В одном варианте осуществления молекулу dsRNA по настоящему изобретению конъюгируют с лигандом через носитель, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолидинила, пиразолидинила, имидазолидинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила,

тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическая группа выбрана из серинолового остова или диэтаноламинового остова.

[00330] Средство, представляющее собой двухнитевую РНК (dsRNA), по настоящему изобретению необязательно может быть конъюгировано с одним или несколькими лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или к обеим нитям на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах. К примеру, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью, в частности, с 3'-концом смысловой нити.

[00331] В некоторых вариантах осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению являются 5'-фосфорилированными или включают фосфорильный аналог на 5' (штрих)-конце. 5'-фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-дифосфат ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-трифосфат ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-гуанозиновый кэп (7-метилованный или неметилованный) ($7\text{m-G}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-аденозиновый кэп (Appp) и любую модифицированную или немодифицированную кэп-структуру нуклеотида ($\text{N}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5'$); 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-моnodитиофосфат (фосфородитиоат; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-фосфоротиолат ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$); любую дополнительную комбинацию кислород/сера-замещенных монофосфата, дифосфата и трифосфатов (например 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т. д.), 5'-фосфорамидаты ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-алкилфосфонаты ($\text{R}=\text{алкил}=\text{метил, этил, изопропил, пропил и т. д., например, RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-, 5'-алкенилфосфонаты (т. е. винил, замещенный винил), (\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-), 5'-алкилэфирфосфонатов (\text{R}=\text{алкиловый эфир}=\text{метоксиметил (MeOCH}_2-), этоксиметил и т. д., например, RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'-). В одном примере модификацию можно поместить в антисмысловую нить молекулы dsRNA.$

Лиганды

[00332] Широкий спектр химических структурных элементов можно соединять с олигонуклеотидами по настоящему изобретению. Предпочтительные фрагменты представляют собой лиганды, которые соединяют, предпочтительно ковалентно, или непосредственно, или опосредованно через промежуточный связывающий фрагмент.

[00333] Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд меняет распределение, нацеливание или время жизни молекулы, в которую он введен. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, *например*, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, *например*, клеточного компартмента или компартмента органа, ткани, органа или участка тела, *например*, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой лиганд. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

[00334] Некоторые лиганды могут обладать эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет pH-зависимую мембранную активность и фузогенность. В некоторых вариантах осуществления эндосомолитический лиганд принимает свою активную конформацию при значении pH эндосомы. "Активной" конформацией является такая конформация, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте), пептид EALA (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте) и их производные (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68, которая включена посредством ссылки во всей ее полноте). В некоторых

вариантах осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), у которой будет меняться заряд или протонирование в ответ на изменение значения pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

[00335] Лиганды могут улучшать транспортировку, гибридизацию и свойства специфичности и могут также улучшать устойчивость к нуклеазам у полученного естественного или модифицированного олигорибонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

[00336] Лиганды, как правило, могут включать терапевтически активные модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для отслеживания распределения; сшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

[00337] Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту) или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленмин,

полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиамин-псевдопептид, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

[00338] Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например, клеткой почки. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактантный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер. В таблице 2 показаны некоторые примеры нацеливающих лигандов и ассоциированных с ними рецепторов.

[00339] Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатирующее средство (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил) глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминок, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин,

витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu^{3+} тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

[00340] Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF- κ B.

[00341] Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение клеткой средства для РНК-интерференции, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством, например, может быть таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

[00342] Лиганд может увеличивать поглощение олигонуклеотида клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лиганды, которые будут обладать таким эффектом, включают фактор некроза опухолей альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1-бета или гамма интерферон.

[00343] Согласно одному аспекту лиганд представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевую ткань, например, отличную от ткани почки целевую ткань организма. Например,

целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (a) повышать устойчивость конъюгата к разрушению, (b) усиливать нацеливание или транспортировку в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

[00344] Лиганд на основе липида можно применять для модулирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, которые связываются с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

[00345] Согласно предпочтительному варианту осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткань, отличную от ткани почек. Однако, предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

[00346] В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почку. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

[00347] Согласно другому аспекту лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Это особенно применимо при лечении нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток.

Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HAS, липопротеин низкой плотности (LDL) и липопротеин высокой плотности (HDL).

[00348] Согласно другому аспекту лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство, обеспечивающее проникновение в клетку. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennapedia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, при этом средство может включать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, и также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазами.

[00349] Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, аналогичную естественному пептиду. Длина пептидного фрагмента или фрагмента-пептидомиметика может составлять приблизительно 5–50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий преимущественно из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. Согласно другому альтернативному варианту пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP. RFGF-

аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид "доставки", который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK), как было обнаружено, способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam et al., Nature, 354:82-94, 1991, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно, пептид или пептидомиметик, связанный со средством для РНК-интерференции, посредством введенной мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Пептидный фрагмент может варьироваться по длине в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно применять для целенаправленного воздействия на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). RGD-пептид может облегчать нацеливание средства для РНК-интерференции на опухоли из целого ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно, RGD-пептид будет облегчать нацеливание средства для РНК-интерференции на почку. RGD-пептид может быть линейным или

циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на специфические ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство для РНК-интерференции к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326–336, 2001, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Можно использовать пептиды, которые нацеливаются на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие клетки. Например, RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут нацеливаться на раковые клетки, в частности, клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролиферации клеток и ангиогенеза. Предпочтительными являются конъюгаты с таким типом лигандов, которые нацеливаются на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например, раковый ген, описанный в данном документе.

[00350] "Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" позволяет проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Seropin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена пептида слияния gp41 HIV-1 и NLS из большого T-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res.

31:2717–2724, 2003, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте).

[00351] В некоторых вариантах осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический α -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические α -спиральные пептиды включают, без ограничений, цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CRF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плевроцидины, пептиды H_2A , пептиды *Xenopus*, эскулентины-1 и церины. Предпочтительно целый ряд факторов будет рассматриваться в связи с поддержанием целостности и стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэпирующий остаток (например, Gly, представляет собой иллюстративный N-кэпирующий остаток), и/или будет использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной H-связи для стабилизации спирали. Стабильность может обеспечивать образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными $i \pm 3$ или $i \pm 4$ положениями. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспартатом.

[00352] Пептидные лиганды и лиганды-пептидомиметики включают лиганды, имеющие встречающиеся в природе или модифицированные пептиды, например, D- или L-пептиды; α -, β - или γ -пептиды; N-метил-пептиды; азапептиды; пептиды, у которых одна или несколько амидных, т. е. пептидных, связей замещена одной или несколькими мочевиными, тиомочевиными, карбаматными или сульфонилмочевиными связями; или циклические пептиды.

[00353] Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-

6P, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер или аптамер. Кластер представляет собой комбинацию двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды рецептора-интегрина, лиганды хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCPRII, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Основу лигандов также может составлять нуклеиновая кислота, например, в случае аптамера. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

[00354] Средства для высвобождения из эндосомы включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, поликатионы, скрытые олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфиры, полимеры со скрытыми или нескрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или нескрытыми катионными или анионными зарядами.

[00355] РК-модулятор означает модулятор фармакокинетических параметров. РК-модулятор включает липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т. д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфоротиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов).

[00356] Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки (например, сывороточными белками) также пригодны в настоящем изобретении в качестве РК-модулирующих лигандов.

[00357] Другие конъюгаты, представляющие собой лиганды, пригодные в настоящем изобретении, описаны в заявках на патент США USSN: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833 934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

[00358] В тех случаях, когда присутствуют два или более лиганда, все лиганды могут обладать одинаковыми свойствами, могут обладать различными свойствами, или некоторые лиганды обладают одинаковыми свойствами, в то время как другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может обладать нацеливающими свойствами, обладать эндосомолитической активностью или обладать РК-модулирующими свойствами. Согласно предпочтительному варианту осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

[00359] Лиганды могут быть присоединены к олигонуклеотидам в разных местах, например, на 3'-конце, 5'-конце и/или во внутреннем положении. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд присоединен к олигонуклеотидам через промежуточный связывающий фрагмент, например, носитель, описанный в данном документе. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на мономере, если указанный мономер вводится в растущую нить. Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть введен путем связывания с мономером-"предшественником" после того, как указанный мономер-"предшественник" был введен в растущую нить. К примеру, мономер, содержащий, например, связывающий фрагмент с аминогруппой на конце (т. е. без ассоциированного лиганда), например $\text{TA}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, может быть введен в растущую олигонуклеотидную нить. На следующей стадии, т. е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с электрофильной группой, например, группой сложного пентафторфенилэфира или альдегидной группой, затем можно прикрепить к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой

нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

[00360] Согласно другому примеру может быть введен мономер с химической группой, подходящей для участия в реакциях клик-химии, например, связывающий фрагмент/линкер с азидной или алкиновой группой на конце. На следующей стадии, т. е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с комплементарной химической группой, например алкиновой или азидной, может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания алкиновой и азидной группы вместе.

[00361] Что касается двухнитевых олигонуклеотидов, то лиганды могут быть присоединены к одной или обоим нитям. Согласно некоторым вариантам осуществления двухнитевое средство для РНК-интерференции содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью. Согласно другим вариантам осуществления двухнитевое средство для РНК-интерференции содержит лиганд, конъюгированный с антисмысловой нитью.

[00362] Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеиновыми основаниями, сахарными фрагментами или межнуклеозидными связями в молекулах нуклеиновых кислот. Конъюгация с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может происходить в любом положении, в том числе по атомам внутри кольца и вне кольца. Согласно некоторым вариантам осуществления к 2-, 6-, 7- или 8-положениям пуринового нуклеинового основания присоединен конъюгатный фрагмент. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть замещены конъюгатным фрагментом. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода в сахарном фрагменте, к которым может быть присоединен конъюгатный фрагмент, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. К положению 1' также может быть присоединен конъюгатный фрагмент, как, например, в остатке, с удаленным азотистым основанием. Межнуклеозидные связи также могут нести

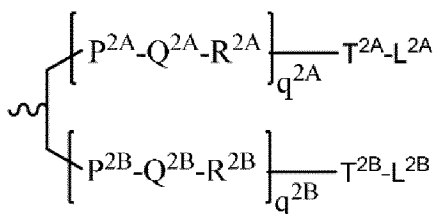
конъюгатные фрагменты. Что касается фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфорамидатной и т. п.), то конъюгатный фрагмент может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, PNA), конъюгатный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

[00363] В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован со смысловой нитью. Как описано в данном документе, лиганд может быть конъюгирован на 3'-конце, 5'-конце или во внутреннем положении смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити. Кроме того, лиганд может быть конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеотидной связью смысловой нити.

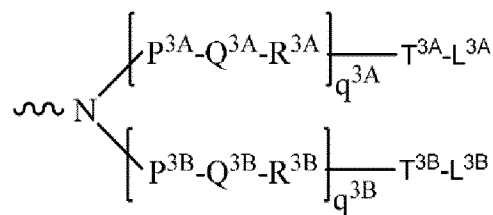
[00364] Можно использовать любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд, хотя лиганд, как правило, представляет собой углевод, например, моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

[00365] Линкеры, посредством которых лиганд конъюгируют с нуклеиновой кислотой, включают описываемые выше. Например, лиганд может представлять собой одно или несколько производных GalNAc (*N*-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

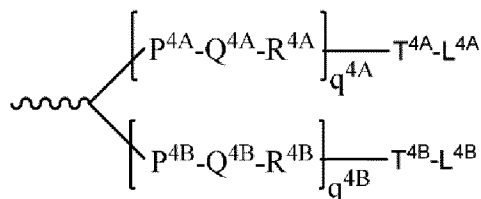
[00366] В некоторых вариантах осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные в любой из формул (IV) – (VII):



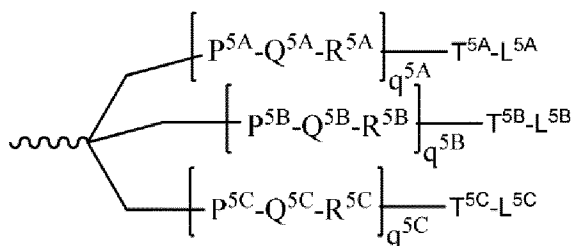
формула (IV)



формула (V)



формула (VI)



формула (VII)

или

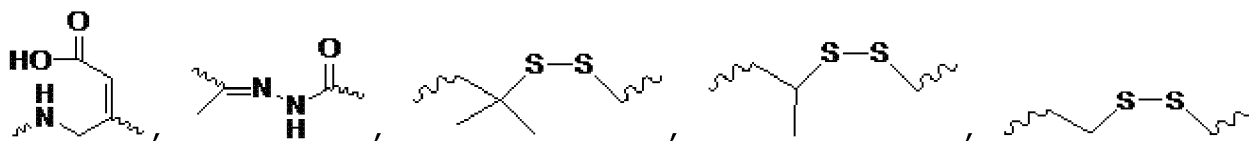
где

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} равняются независимо в каждом случае 0–20, и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где одна или несколько метиленовых групп могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R^I)=C(R^{I'}), C≡C или C(O);

каждый из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), –C(O)–CH(R^a)–NH–, CO, CH=N–O,



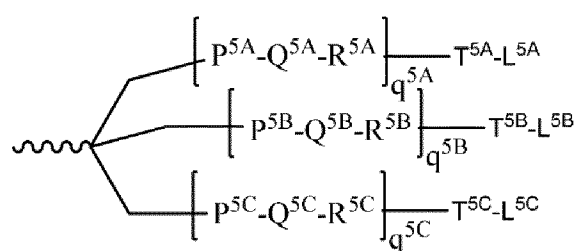
или гетероциклил;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо в каждом случае представляет

собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

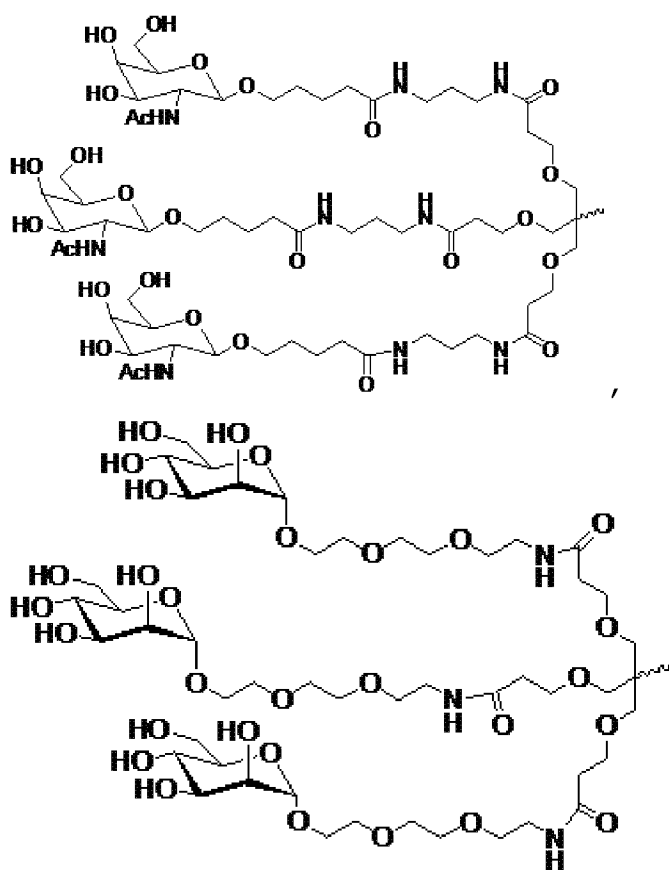
[00367] В случае средств для RNAi, служащих для ингибирования экспрессии целевого гена, особенно применимы трехвалентные линкеры, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, такие как линкеры формулы (VII):

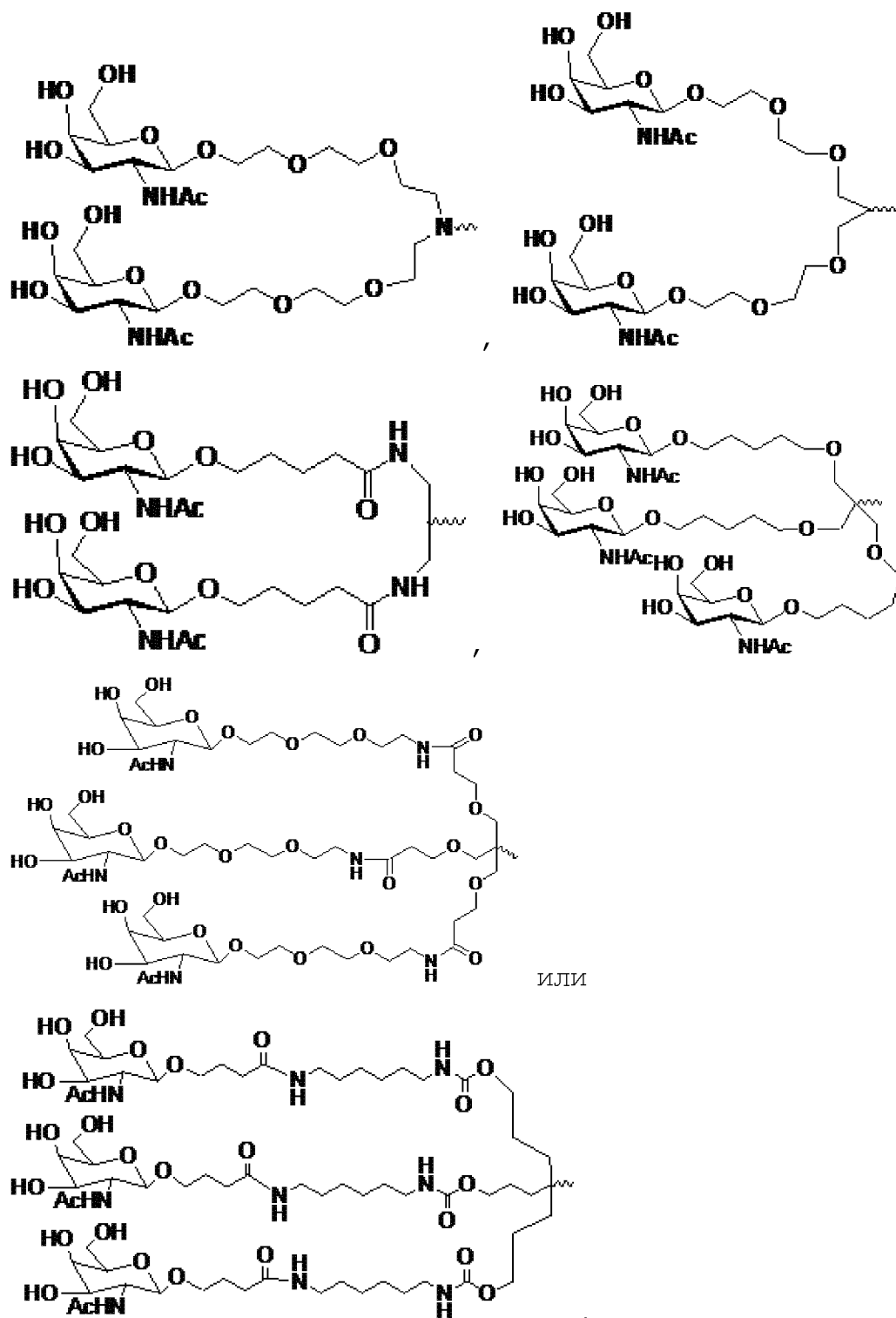


формула (VII)

где L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой моносахарид, такой как производное GalNAc.

[00368] Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, включают без ограничения следующие соединения:





Определения

[00369] Используемые в данном документе термины "dsRNA", "siRNA" и "средство для РНК-интерференции" используются взаимозаменяемо для обозначения средств, которые могут опосредовать сайленсинг целевой РНК, например mRNA, например транскрипта гена, кодирующего белок. Для удобства такая mRNA в данном документе также называется как подлежащая сайленсингу

mRNA. Такой ген также называется целевым геном. В общем смысле подлежащая сайленсингу РНК представляет собой эндогенный ген или ген патогена. Кроме того, РНК, отличные от mRNA, например tRNA и вирусные РНК, также можно подвергать целенаправленному воздействию.

[00370] Используемое в данном документе выражение "опосредовать RNAi" относится к способности осуществлять сайленсинг целевой РНК посредством специфического к последовательности механизма. Не желая быть ограниченным какой-либо теорией, полагаются, что при сайленсинге используется система или процесс RNAi и направляющая РНК, например, средство, представляющее собой siRNA из 21-23 нуклеотидов.

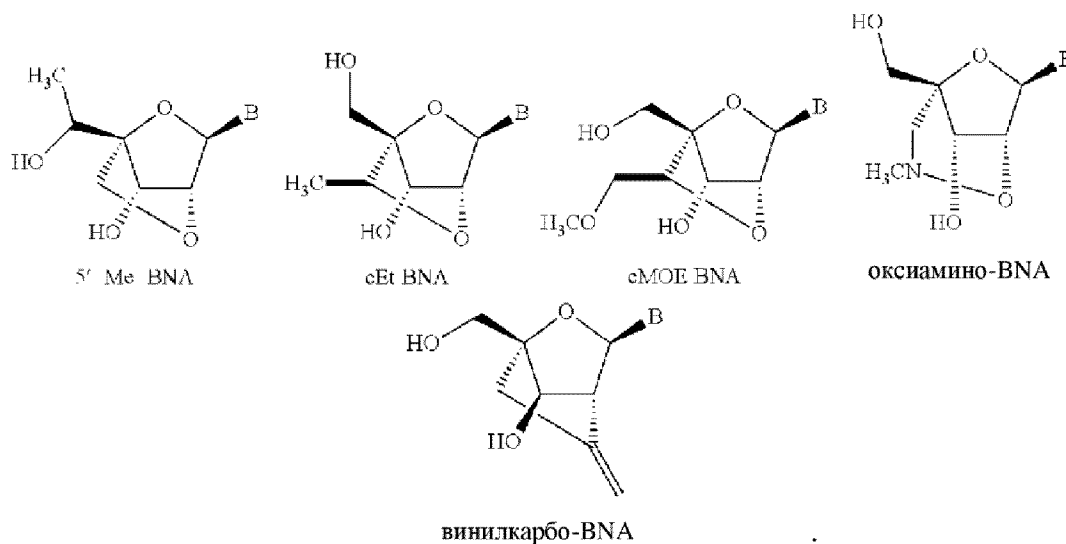
[00371] Используемые в данном документе "специфически гибридизуемый" и "комплементарный" представляют собой термины, которые используются для обозначения достаточной степени комплементарности, при которой между соединением по настоящему изобретению и молекулой целевой РНК происходит стабильное и специфическое связывание. Для специфического связывания требуется достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигомерного соединения с нецелевыми последовательностями в условиях, при которых надеются получить специфическое связывание, т. е. при физиологических условиях в случае анализов или терапевтического лечения или же, в случае *in vitro* анализов, в условиях, при которых проводят анализы. Как правило, нецелевые последовательности отличаются по меньшей мере 5 нуклеотидами.

[00372] В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению является "в достаточной степени комплементарной" с целевой РНК, например целевой mRNA, так что молекула dsRNA приводит к сайленсингу выработки белка, кодируемого целевой mRNA. В другом варианте осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению является "полностью комплементарной" с целевой РНК, например целевая РНК и средство на основе dsRNA-дуплекса гибридируются, например, с образованием гибрида, полученного исключительно за счет спаривания оснований по Уотсону-Крику в участке полной комплементарности.

"Достаточная степень комплементарности" с целевой РНК может распространяться на внутренний участок (например, по меньшей мере из 10 нуклеотидов), который полностью комплементарен с целевой РНК. Более того, в некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению специфически распознает различие в один нуклеотид. В данном случае молекула dsRNA опосредует RNAi лишь тогда, когда установлена полная комплементарность в участке (например, в пределах 7 нуклеотидов) с различием в один нуклеотид.

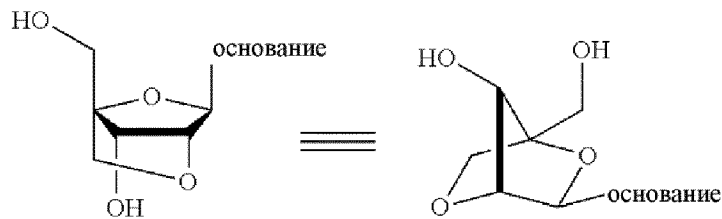
[00373] Используемый в данном документе термин "олигонуклеотид" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), например, длина которой составляет менее 100, 200, 300 или 400 нуклеотидов.

[00374] Термин 'BNA' относится к мостиковой нуклеиновой кислоте, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК. BNA может содержать 5-, 6-членную или даже 7-членную мостиковую структуру с "фиксированным" C₃'-эндо выступом сахара. Как правило, мостик встраивают на 2'-, 4'-положении рибозы с получением нуклеотида 2', 4'-BNA (например, LNA или ENA). Примеры нуклеотидов BNA включают следующие нуклеозиды:



[00375] Термин 'LNA' относится к запертой нуклеиновой кислоте, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК. LNA представляет собой модифицированный нуклеотид РНК. Рибозный фрагмент в нуклеотиде LNA модифицируют с помощью дополнительного мостика (например, метиленового мостика или

этиленового мостика), соединяющего 2'-гидроксил с 4'-углеродом того же рибозного сахара. К примеру, мостик может "запирать" рибозу в конформации 3'-эндо (северная):



[00376] Термин 'ENA' относится к нуклеиновой кислоте с этиленовыми мостиками, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК.

[00377] В данном документе "сайт расщепления" означает связь в остоле целевого гена или смысловой нити, которая расщепляется с помощью системы RISC при использовании средства для РНК-интерференции. При этом целевой участок сайта расщепления содержит по меньшей мере один или по меньшей мере два нуклеотида на обеих сторонах сайта расщепления. В случае смысловой нити сайт расщепления представляет собой связь в остоле смысловой нити, которая должна расщепляться, когда смысловая нить сама по себе стала мишенью, подлежащей расщеплению с помощью механизма RNAi. Сайт расщепления можно определять с использованием способов, известных из уровня техники, например, анализа 5'-RACE, подробно описанного в публикации Soutschek et al., *Nature* (2004) 432, 173-178, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. Как хорошо известно из уровня техники, участок сайта расщепления для конического двухнитевого средства для RNAi, содержит две нити длиной 21 нуклеотид (где эти нити образуют двухнитевой участок из 19 последовательных пар оснований с одонитевыми "липкими" концами из 2 нуклеотидов на 3'-концах), при этом участок сайта расщепления соответствует положениям 9-12 от 5'-конца смысловой нити.

Расщепляемые линкерные группы

[00378] Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при

попадании в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления молекулы dsRNA в соответствии с настоящим изобретением расщепляемая линкерная группа расщепляется приблизительно в 10 раз или более, предпочтительно в по меньшей мере 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования внутриклеточных условий), чем в крови субъекта или при втором стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования условий, свойственных крови или сыворотке).

[00379] Расщепляемые линкерные группы чувствительны к средствам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или встречаются на более высоких уровнях или обладают большей активностью внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не обладают специфичностью к субстрату, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую с помощью редокс-потенциала линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие средства, которые приводят к значению pH, равному пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидаз (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатаз.

[00380] Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к значению pH. Значение pH сыворотки человека составляет 7,4, в то время как среднее значение pH внутри клетки немного ниже, и находится в диапазоне приблизительно 7,1–7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением pH в диапазоне 5,5–6,0, а лизосомы

характеризуются еще более кислым значением pH, около 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении pH, высвобождая тем самым катионный липид из лиганда внутрь клетки или в требуемый компартмент клетки.

[00381] Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, на которую производится нацеливание. Например, лиганды, нацеливающий на печень, можно связать с катионными липидами через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, которые не характеризуются высоким содержанием эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

[00382] Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на типы клеток с высоким содержанием пептидаз, такие как клетки печени и синовиоциты.

[00383] Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы может быть оценена с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью. Таким образом можно определить чувствительность к расщеплению, соответствующую первым и вторым условиям, при этом первые условия выбирают так, чтобы они характеризовали расщепление в целевой клетке, а вторые условия выбирают так, чтобы они характеризовали расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно выполнить первоначальные измерения в условиях бесклеточной системы или в условиях

культуры и подтвердить путем дальнейших измерений на животных в целом. Согласно предпочтительным вариантам осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

Расщепляемые с помощью редокс-потенциала линкерные группы

[00384] Одним классом расщепляемых линкерных групп являются расщепляемые с помощью редокс-потенциала линкерные группы, которые можно использовать в молекуле dsRNA в соответствии с настоящим изобретением, при этом эти группы расщепляются при восстановлении или окислении. Примером линкерной группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная линкерная группа ($-S-S-$). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом для РНК-интерференции и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидата можно оценить при инкубировании с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, в целевой клетке. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке. Согласно предпочтительному варианту осуществления самое большее 10% кандидатных соединений расщепляются в крови. Согласно предпочтительным вариантам осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Степень расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях,

выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Фосфатные расщепляемые линкерные группы

[00385] Фосфатные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в молекуле dsRNA в соответствии с настоящим изобретением, расщепляются под действием средств, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. Предпочтительными вариантами осуществления являются $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Предпочтительным вариантом осуществления является $-O-P(O)(OH)-O-$. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые кислотой линкерные группы

[00386] Расщепляемые кислотой линкерные группы, которые можно использовать в молекуле dsRNA в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой линкерные группы, которые расщепляются в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде при значении pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже) или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить среду для расщепления расщепляемых кислотами линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$.

Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Сложноэфирные линкерные группы

[00387] Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в молекуле dsRNA в соответствии с настоящим изобретением, расщепляются под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы клетки. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Пептидные расщепляемые группы

[00388] Пептидные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в молекуле dsRNA в соответствии с настоящим изобретением, расщепляются под действием ферментов, таких как пептидазы и протеазы клетки. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают в себя амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами, с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничивается пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу полностью. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$, где R^A и R^B представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Используемый в данном документе термин "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод *per se*, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или к соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, каждое из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4–9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают C₅ и выше (предпочтительно C₅–C₈) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными звеньями (предпочтительно C₅–C₈).

[00389] Настоящее изобретение дополнительно относится к применению молекулы dsRNA, определенной в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению молекулы dsRNA для подавления экспрессии целевого гена *in vitro*.

[00390] Настоящее изобретение дополнительно относится к молекуле dsRNA, определенной в данном документе, для применения в подавлении экспрессии целевого гена у субъекта. Субъект может представлять собой любое животное, такое как млекопитающее, например мышь, крыса, овца, крупный рогатый скот, собака, кошка или человек.

[00391] В некоторых вариантах осуществления молекулу dsRNA по настоящему изобретению вводят в буфере.

[00392] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе соединения, представляющие собой siRNA, можно составлять для введения субъекту. Составленная композиция,

содержащая siRNA, может допускать пребывание в различных состояниях. Согласно некоторым примерам данная композиция является по меньшей мере частично кристаллической, однородно кристаллической и/или безводной (например, содержит менее 80, 50, 30, 20 или 10% воды). Согласно другому примеру siRNA находится в водной фазе, например, в растворе, который включает воду.

[00393] Водную фазу или кристаллические композиции, например, можно ввести в средство доставки, например, в липосому (в частности, в случае водной фазы) или в частицу (например, микрочастицу, которая может быть подходящей для кристаллической композиции). В целом композицию на основе siRNA составляют таким способом, который совместим с предполагаемым способом введения, описанным в данном документе. Например, согласно конкретным вариантам осуществления композицию получают при помощи по меньшей мере одного из следующих способов: высушивание распылением, лиофилизация, вакуумная сушка, выпаривание, высушивание в псевдооживленном слое или комбинация данных методик; или ультразвуковая обработка с липидами, сушка вымораживанием, конденсация и другие способы самосборки.

[00394] Препарат на основе siRNA может быть составлен в комбинации с другим средством, например, с другим терапевтическим средством или средством, которое стабилизирует siRNA, например, белком, который образует комплекс с siRNA с образованием iRNP. Еще одни средства включают хелатирующие средства, например EDTA (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКазы (например, ингибиторы РНКазы с широким спектром специфичности, такие как RNasin®) и так далее.

[00395] В некоторых вариантах осуществления препарат на основе siRNA включает другое соединение, представляющее собой siRNA, например вторую siRNA, которая может опосредовать RNAi в отношении второго гена или в отношении того же гена. Еще один препарат может включать по меньшей мере 3, 5, десять, двадцать, пятьдесят или сто или более разных видов siRNA. Такие siRNA

могут опосредовать RNAi в отношении аналогичного числа разных генов.

[00396] В некоторых вариантах осуществления препарат на основе siRNA включает по меньшей мере второе терапевтическое средство (например, средство, отличное от РНК или ДНК). Например, композиция на основе siRNA для лечения вирусного заболевания, например, ВИЧ, может включать известное противовирусное средство (например, ингибитор протеазы или ингибитор обратной транскриптазы). Согласно другому примеру композиция на основе siRNA для лечения рака может дополнительно содержать химиотерапевтическое средство.

[00397] Ниже обсуждаются иллюстративные составы, которые можно использовать для введения молекулы dsRNA в соответствии с настоящим изобретением.

[00398] *Липосомы* Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что данные составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, модифицированными siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Препарат на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения, представляющего собой ssiRNA, (например, на основе предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой siRNA, например, соединение, представляющее собой двухнитевую siRNA, или соединение, представляющего собой ssiRNA, или их предшественник) может быть составлен для доставки в мембранно-молекулярном комплексе, например, в липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные

везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе siRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе siRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, в случае нанесения липосом на ткань бислоем липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того, как происходит слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое содержит siRNA, доставляется в клетку, где siRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления siRNA в конкретные типы клеток.

[00399] Липосому, содержащую средство, представляющее собой siRNA, можно получать с помощью ряда способов. Согласно одному примеру липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования мицелл из липидного компонента. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат на основе средства, представляющего собой siRNA, затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют с siRNA и конденсируются вокруг siRNA с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, путем диализа, с получением липосомного препарата на основе siRNA.

[00400] При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от

нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать значение pH для содействия конденсации.

[00401] Дополнительное описание способов получения стабильных средств доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов средства доставки, описаны, например, в документе WO 96/37194. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в публикации Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham, et al. *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983 и Fukunaga, et al. *Endocrinol.* 115:757, 1984, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов с размером, соответствующим для использования в качестве средств для доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Микрофлюидизацию можно использовать в тех случаях, когда требуются стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Данные способы легко адаптировать для упаковки препаратов на основе siRNA в липосомы.

[00402] Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают молекулы нуклеиновых кислот вместо образования комплекса с ними. Поскольку как молекулы нуклеиновых кислот, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее некоторые молекулы нуклеиновых кислот оказываются захваченными внутри водного внутреннего пространства этих липосом. pH-чувствительные липосомы использовались для доставки ДНК, кодирующей ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре.

Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 19, (1992) 269–274, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте).

[00403] Один основной тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции для нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции для анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

[00404] Примеры других способов для введения липосом в клетки *in vitro* включены в патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993 и Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

[00405] В некоторых вариантах осуществления применяют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом состоит в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны сливаться настолько же эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и их можно использовать для доставки siRNA в макрофаги.

[00406] Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; в липосомы можно включать множество водо- и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать siRNA, инкапсулированные в их внутренние компартменты, от метаболического превращения и разрушения (Rosoff в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных

составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

[00407] Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид $N-[1-(2,3\text{-диолеилокси})\text{пропил}]-N,N,N\text{-триметиламмония}$ (DOTMA), можно использовать для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке siRNA (см., например, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 для описания DOTMA и его использования с ДНК, которые включены посредством ссылки по всей своей полноте).

[00408] Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

[00409] Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают такие соединения, которые были конъюгированы с

рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиооктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPES") (см., например, патент США № 5171678).

[00410] Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помощью холестерина ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

[00411] Липосомные составы особенно подходят для местного применения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие, связанное с интенсивной системной абсорбцией введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в требуемой мишени и возможность введения siRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы применяют для доставки siRNA в клетки эпидермиса, а также для улучшения проникновения siRNA в ткани дермы, например, в кожу. Например, липосомы можно наносить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств,

составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276. 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987, который включены посредством ссылки во всей своей полноте).

[00412] Также исследовались неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы с siRNA применимы для лечения дерматологического нарушения.

[00413] Липосомы, которые включают siRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, типом деформируемых липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомную композицию. Трансферсомы, которые включают siRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки siRNA в кератиноциты кожи. Для того, чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и, зачастую, могут достигать

своих мишеней без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

[00414] Другие составы, применимые в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках на патенты США с порядковыми №№ 61/018616, поданной 2 января 2008 года; 61/018611, поданной 2 января 2008 года; 61/039748, поданной 26 марта 2008 года; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 года, и 61/051528, поданной 8 мая 2008 года. В РСТ заявке № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

[00415] *Поверхностно-активные вещества* Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что данные составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой модифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (включая микроэмульсии) и липосомы (см. выше). Композиции на основе siRNA (или предшественника, например, более крупных dsRNA, которые могут процессироваться в siRNA, или ДНК, которые кодируют siRNA или предшественник) могут включать поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления siRNA составляют в виде эмульсии, которая включает поверхностно-активное вещество. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы обеспечивает наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в составах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).

[00416] Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионогенное

поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических продуктах, и их можно применять в широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицериловые эфиры, сложные полиглицериловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, как, например, этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-сополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

[00417] Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламидаминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

[00418] Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее применяемыми представителями данного класса.

[00419] Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести как положительный, так и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

[00420] Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).

[00421] *Мицеллы и другие мембранные составы* Для простоты изложения мицеллы и другие составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что мицеллы и другие составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой модифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Композиция на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения, представляющего собой ssiRNA, (например, на основе предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой siRNA, например, соединение, представляющее собой двухнитевую siRNA, или соединение, представляющее собой ssiRNA, или их предшественник) может быть представлена в виде мицеллярного состава. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

[00422] Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе siRNA, C₈-C₂₂алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут формироваться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

[00423] Согласно одному способу получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию на основе siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. Согласно другому способу мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

[00424] Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами.

Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

[00425] Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т. е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного аэрозоля.

[00426] Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

[00427] Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены при помощи проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто требуется увеличить, например, по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

[00428] Частицы Для простоты изложения частицы, составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой модифицированную siRNA. Однако следует понимать, что эти частицы и другие составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой немодифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Согласно другому варианту осуществления препараты на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения, представляющего собой ssiRNA, (например, на основе

предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой siRNA, например, соединение, представляющее собой двухнитевую siRNA, или соединение, представляющее собой ssiRNA, или их предшественник) могут быть введены в частицу, например, в микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдоожиженном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

Фармацевтические композиции

[00429] Средства для РНК-интерференции по настоящему изобретению могут быть составлены для применения в фармации. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей определенную в данном документе молекулу dsRNA. Фармацевтически приемлемые композиции содержат терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул dsRNA по любому из предшествующих вариантов осуществления, взятых отдельно или составленных вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками), наполнителями и/или разбавителями.

[00430] В частности, фармацевтические композиции могут быть составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая композиции, которые адаптированы для следующего: (1) перорального введения, например, жидкие лекарственные формы (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, таблетки, предназначенные для трансбуккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентерального введения, например, посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции, как, например, стерильный раствор или суспензия, или состав с замедленным высвобождением; (3) местного нанесения, например, в виде наносимых на кожу крема, мази или пластыря или распыляемого раствора с контролируемым высвобождением; (4) интравагинального

или внутримышечного введения, например, в виде пессария, крема или пены; (5) подъязычного введения; (6) глазного введения; (7) трансдермального или (8) интраназального введения. Особенно предпочтительной может быть доставка с использованием подкожных или внутривенных способов введения.

[00431] Используемая в данном документе фраза "терапевтически эффективное количество" означает, такое количество соединения, материала или композиции, содержащих соединение по настоящему изобретению, которое является эффективным для создания некоторого требуемого терапевтического эффекта по меньшей мере у субпопуляции клеток в животном при приемлемом соотношении польза/риск, применимом для любого терапевтического лечения.

[00432] Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

[00433] Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, вспомогательное вещество при производстве (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее

производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемообразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты, (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

[00434] С целью удобства составы могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области фармации. Количество активного ингредиента, который можно объединять с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от реципиента, подлежащего лечению, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединять с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, обычно будет представлять собой количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из расчета сто процентов данное количество будет варьироваться от приблизительно 0,1 процента до приблизительно девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5 процентов до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно от приблизительно 10 процентов до приблизительно 30 процентов.

[00435] Согласно определенным вариантам осуществления состав по настоящему изобретению содержит наполнитель, выбранный из группы, состоящей из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих средств, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например, сложных полиэфиров и полиангидридов; и соединение по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления вышеуказанный состав придает биологическую доступность при пероральном введении соединению по настоящему изобретению.

[00436] Препарат на основе средств для РНК-интерференции может быть составлен в комбинации с другим средством, например, другим терапевтическим средством или средством, которое придает стабильность средству для РНК-интерференции, например, белок, который в совокупности со средством для РНК-интерференции образует iRNP. Еще одни средства включают хелатирующие средства, например EDTA (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКазы (например, ингибиторы РНКазы с широким спектром специфичности, такие как RNasin®) и так далее.

[00437] Способы получения этих составов или композиций включают стадию объединения соединения по настоящему изобретению с носителем и, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения по настоящему изобретению с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или обоими, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

[00438] В ряде случаев для пролонгирования эффекта лекарственного средства требуется замедлить всасывания лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии на основе кристаллического или аморфного материала, имеющего слабую растворимость в воде. К тому же скорость всасывания лекарственного средства зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и от кристаллической формы. В качестве альтернативы

замедленного всасывания парентерально вводимой формы лекарственного средства достигают путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

[00439] Соединения по настоящему изобретению можно составлять для введения любым общепринятым способом для применения в медицине или в ветеринарной медицине аналогично другим фармацевтическим препаратам.

[00440] Подразумевается, что термин "лечение" охватывает также профилактику, терапию и излечение. Пациент, получающий данный вид лечения, представляет собой любое животное, требующее этого, включая приматов, в частности, людей, а также других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свинья и овца; а также домашняя птица и домашние питомцы в общем смысле.

[00441] Двухнитевые средства для RNAi образуются в клетке *in vivo*, например, на основании экзогенных ДНК-матриц, которые доставляют в клетку. Например, ДНК-матрицы можно встраивать в векторы и использовать в качестве векторов для генной терапии. Векторы для генной терапии можно доставлять субъекту, например, путем внутривенной инъекции, местного введения (патент США № 5328470, который включен посредством ссылки во всей своей полноте) или стереотаксической инъекции (см., например, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Фармацевтический препарат на основе вектора для генной терапии может включать вектор для генной терапии в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу для замедленного высвобождения, в которую заключено средство доставки генов. ДНК-матрицы могут включать, например, две транскрипционные единицы, на одной из которых образуется транскрипт, который включает в себя верхнюю нить молекулы dsRNA, а на другой образуется транскрипт, который включает в себя нижнюю нить молекулы dsRNA. Когда матрицы транскрибированы, происходит образование молекулы dsRNA, и она подвергается процессингу на фрагменты средства, представляющего собой siRNA, которые опосредуют сайленсинг генов.

Пути доставки

[00442] Молекулу dsRNA, определенную в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащую молекулу dsRNA, определенную в данном документе, можно вводить субъекту с применением разных путей доставки. Композиция, включающая средство для РНК-интерференции, может быть доставлена субъекту с помощью разных путей. Иллюстративные пути включают: внутривенный, подкожный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, интраназальный, легочной, глазной.

[00443] Молекулы для РНК-интерференции и/или молекула dsRNA по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Как правило, такие композиции включают один или несколько видов средств для РНК-интерференции и фармацевтически приемлемый носитель. Используемая в данном документе формулировка "фармацевтически приемлемый носитель" предназначена для включения любых растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, средств для придания изотоничности и средств, задерживающих всасывание, и т.п., совместимых с применением в фармацевтических препаратах. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением тех случаев, когда какая-либо стандартная среда или средство не совместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

[00444] Композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли местное или системное лечение, и от участка, подлежащего обработке. Введение может быть местным (в том числе офтальмическим, вагинальным, ректальным, интраназальным, трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное введение, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию, или интратекальное или интравентрикулярное введение.

[00445] Путь и место введения можно выбрать для увеличения целенаправленного воздействия. Например, для целенаправленного

воздействия на мышечные клетки логическим выбором будет внутримышечная инъекция в мышцы, представляющие интерес. Целенаправленно воздействовать на клетки легких можно путем введения средства для РНК-интерференции в форме аэрозоля. Целенаправленно воздействовать на клетки эндотелия сосудов можно путем нанесения средства для РНК-интерференции на баллонный катетер и механического введения ДНК.

Дозировка

[00446] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ введения молекулы dsRNA, например средства, представляющего собой siRNA, субъекту (например, человеку-субъекту). В другом аспекте настоящее изобретение относится к молекуле dsRNA, определенной в данном документе, для применения в подавлении экспрессии целевого гена у субъекта. Способ или применение для медицинских целей включает введение разовой дозы молекулы dsRNA, например средства, представляющего собой siRNA, например средства, представляющего собой двухнитевую siRNA, при этом (a) длина двухнитевой части которого составляет 14-40 нуклеотидов (нт), например 21-23 нт, (b) которое комплементарно целевой РНК (например, эндогенной или целевой РНК патогена) и, необязательно, (c) которое включает по меньшей мере один 3'-"липкий" конец длиной в 1-5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления разовая доза составляет менее 10 мг на кг массы тела или менее 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 или 0,00001 мг на кг массы тела, и менее 200 нмоль средства, представляющего собой РНК (например, приблизительно $4,4 \times 10^{16}$ копий), на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 нмоль средства, представляющего собой РНК, на кг массы тела.

[00447] Заданное количество может представлять собой количество, которое эффективно для лечения или предупреждения заболевания или нарушения, например, заболевания или нарушения, ассоциированных с целевой РНК. Например, разовую дозу можно вводить путем инъекции (например, внутривенной, подкожной или внутримышечной), в виде вдыхаемой дозы или местного нанесения.

Согласно некоторым вариантам осуществления дозы могут составлять менее 10, 5, 2, 1 или 0,1 мг/кг массы тела.

[00448] Согласно некоторым вариантам осуществления разовую дозу вводят с частотой менее одного раза в день, *например*, менее одного раза каждые 2, 4, 8 или 30 дней. Согласно другому варианту осуществления разовую дозу не вводят с определенной частотой (*например*, с нерегулярной частотой). Например, разовую дозу можно вводить однократно.

[00449] В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу вводят наряду с другими традиционными терапевтическими воздействиями. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется вирусная инфекция, при этом воздействие представляет собой применение противовирусного средства, отличного от молекулы dsRNA, например отличного от средства, представляющего собой siRNA. В другом варианте осуществления у субъекта имеется атеросклероз, при этом эффективную дозу молекулы dsRNA, например средства, представляющего собой siRNA, вводят в комбинации, например после хирургического вмешательства, например ангиопластики.

[00450] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз молекулы dsRNA, например средства, представляющего собой siRNA (*например*, предшественника, например более крупную молекулу dsRNA, которая может быть подвергнута процессингу в средство, представляющее собой siRNA, или ДНК, которая кодирует молекулу dsRNA, например средство, представляющее собой siRNA, или его предшественника). Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или более низкими, чем начальная доза, *например*, вполовину меньше исходной дозы. Поддерживающий режим может включать лечение субъекта с помощью дозы или доз в диапазоне от 0,01 мкг до 15 мг/кг массы тела в день, *например*, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,00001 мг на кг массы тела в день. Например, поддерживающие дозы вводят не более одного раза каждые 2, 5, 10 или 30 дней. Кроме того, режим лечения может продолжаться в течение периода времени, который будет варьироваться в зависимости от природы конкретного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. Согласно

определенным вариантам осуществления дозу можно доставлять не более одного раза в день, например, не более одного раза в 24, 36, 48 или более часов, например, не более одного раза каждые 5 или 8 дней. После лечения пациента подвергают мониторингу в отношении изменений в его состоянии и в отношении облегчения симптомов болезненного состояния. Дозу соединения можно увеличить в случае, если пациент в достаточной степени реагирует на текущие уровни доз, или же дозу можно снизить, если наблюдают облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние было ослаблено, или в случае наблюдения нежелательных побочных действий.

[00451] Эффективную дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух или более доз, при необходимости или если это считается целесообразным в определенных обстоятельствах. Если требуется облегчить проведение повторных или частых инфузий может быть целесообразной имплантация устройства для доставки, например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интрацистернального или внутрисуставного) или резервуара.

[00452] В некоторых вариантах осуществления композиция включает множество видов молекул dsRNA. В другом варианте осуществления вид молекулы dsRNA имеет последовательности, которые не перекрываются и не смежны с последовательностями другого вида, с учетом встречающейся в природе целевой последовательности. В другом варианте осуществления множество видов молекул dsRNA является специфическим для различных встречающихся в природе целевых генов. В другом варианте осуществления молекула dsRNA является аллельспецифической.

[00453] Описанные в данном документе молекулы dsRNA по настоящему изобретению можно вводить млекопитающим, в частности, крупным млекопитающим, таким как приматы, отличные от человека, или люди, посредством множества путей.

[00454] В некоторых вариантах осуществления композицию на основе молекулы dsRNA, например средства, представляющего собой siRNA, вводят с помощью парентерального, например внутривенного (например, в виде болюсной или диффундирующей инфузии),

внутрикожного, внутрибрюшинного, внутримышечного, интратекального, интравентрикулярного, интракраниального, подкожного, чресслизистого, трансбуккального, сублингвального, эндоскопического, ректального, перорального, вагинального, местного, легочного, интраназального, уретрального или глазного пути. Введение может осуществляться субъектом или другим лицом, например, медицинским работником. Лекарственный препарат может обеспечиваться в виде отмеренных доз или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные режимы доставки более подробно обсуждаются ниже.

[00455] В настоящем изобретении предусмотрены способы, композиции и наборы для ректального введения или доставки описанных в данном документе молекул dsRNA.

[00456] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам dsRNA по настоящему изобретению, предназначенным для применения в описанных выше способах.

Способы подавления экспрессии целевого гена

[00457] Варианты осуществления по настоящему изобретению также относятся к способам подавления экспрессии целевого гена. Способ предусматривает стадию введения молекул dsRNA по любому из предыдущих вариантов осуществления в количестве, достаточном для подавления экспрессии целевого гена. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению молекулы dsRNA, определенной в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена в целевой клетке. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению молекулы dsRNA для подавления экспрессии целевого гена в целевой клетке *in vitro*.

[00458] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу модуляции экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающему доставку в указанную клетку молекулы dsRNA по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления целевой ген выбран из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, гена PDGF-бета, гена Erb-B, гена Src, гена CRK, гена GRB2, гена RAS, гена MEKK, гена JNK,

гена RAF, гена Erk1/2, гена PCNA(p21), гена MYB, гена JUN, гена FOS, гена BCL-2, гепцидина, активированного белка C, гена циклина D, гена VEGF, гена EGFR, гена циклина A, гена циклина E, гена WNT-1, гена бета-катенина, гена c-MET, гена PKC, гена NFkB, гена STAT3, гена сурвивина, гена Her2/Neu, гена топоизомеразы I, гена топоизомеразы II альфа, мутаций в гене p73, мутаций в гене p21(WAF1/CIP1), мутаций в гене p27(KIP1), мутаций в гене PPM1D, мутаций в гене RAS, мутаций в гене кавеолина I, мутаций в гене MIB I, мутаций в гене MTA1, мутаций в гене M68, мутаций в генах-супрессорах опухоли и мутаций в гене-супрессоре опухоли p53.

[00459] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекулам dsRNA по настоящему изобретению, предназначенным для применения в описанных выше способах.

[00460] Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как дополнительно ограничивающие. Содержание всех ссылок, заявок на патент, находящихся на рассмотрении, и опубликованных патентов, цитируемых на протяжении данной заявке, тем самым явным образом включено посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Скрининг siRNA-дуплексов *in vitro*

Культура клеток и трансфекции

[00461] Клетки Нер3В человека или клетки H.II.4.E крысы (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конфлюентности при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в RPMI (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), до отделения от культуральной чашки путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл siRNA-дуплексов на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. 80 мкл полной питательной среды без антибиотика, содержащей ~2 x10⁴ клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение либо 24 часов, либо 120 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с использованием

однократной дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты для определения эффекта дозы выполняли с использованием 8 последовательных 4-кратных серийных разведений, при этом максимальная доза конечной концентрации дуплекса составляла 10 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen, № по кат. 610-12):

[00462] Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 минут при 850 об./мин. с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на всем протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 минуты. Магнитные гранулы удерживали при помощи магнитной установки и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и перемешивали в течение 5 минут. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 минуты. Гранулы вновь удерживали и супернатант удаляли. Затем гранулы промывали 150 мкл промывочного буфера В, удерживали и супернатант удаляли. На следующей стадии гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, удерживали и супернатант удаляли. Гранулы оставляли высыхать в течение 2 минут. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и перемешивали в течение 5 минут при 70°C. Гранулы удерживали с помощью магнита в течение 5 минут. Удаляли 40 мкл супернатанта и вносили в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

[00463] Мастер-микс из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 1,6 мкл H₂O на реакцию добавляли к 5 мкл общей РНК. cDNA получали с использованием термоциклера Bio-Rad

C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин., 37°C 120 мин., 85°C 5 с, хранение при 4°C.

ПЦР в режиме реального времени

[00464] 2 мкл cDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E (человек), № по кат. 4308313 (грызун)), 0,5 мкл зонда TaqMan для TTR (Applied Biosystems № по кат. HS00174914 _m1 (человек), № по кат. Rn00562124_m1 (крыса)) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночной планшете (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени осуществляли в устройстве для ПЦР в режиме реального времени Roche LC480 (Roche). Каждый дуплекс исследовали по меньшей мере по двум независимым трансфекциям и каждую трансфекцию оценивали в двух повторностях, если не указано иное.

[00465] Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955 (нацеливающийся контроль с Luc), или клетками с имитацией трансфекции. Значения IC_{50} рассчитывали с помощью модели подбора по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно клеток, трансфицированных AD-1955, или наивных клеток при таком же диапазоне доз или относительно собственной наименьшей дозы. Значения IC_{50} рассчитывали для каждой отдельной трансфекции, а также для комбинации, при этом отдельное значение IC_{50} согласовывали с данными обеих трансфекций.

[00466] Результаты сайленсинга гена под действием иллюстративного siRNA-дуплекса с различными модификациями мотивов по настоящему изобретению показаны в таблице ниже.

Пример 2. Синтез РНК и гибридизация дуплексов

1. Синтез олигонуклеотидов

[00467] Все олигонуклеотиды синтезировали на установке для синтеза АКТА oligopilot или на установке для синтеза ABI 394. Если не указано иное, для синтеза олигонуклеотидов использовали коммерчески доступную твердую подложку из стекла с

контролируемым размером пор (dT-CPG, 500Å, Prime Synthesis) и РНК-фосфоамидиты со стандартными защитными группами, 5'-O-диметокситритил-N6-бензоил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-цитидин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит, 5'-O-диметилнокситритил-N2-изобутирил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-гуанозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит и 5'-O-диметокситритил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-уридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит (Pierce Nucleic Acids Technologies). 2'-F-фосфоамидиты, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-фтор-цитидин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит и 5'-O-диметокситритил-2'-фторуридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфоамидит приобретали у Promega. Все фосфоамидиты использовали в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (CH₃CN), за исключением гуанозина, который использовали в концентрации 0,2 М в 10% THF/ACN (об./об.). Время связывания/повторения цикла составляло 16 минут. Активатор представлял собой 5-этилтиотетразол (0,75 М, American International Chemicals), для PO-окисления использовали йод/воду/пиридин, а для PS-окисления использовали PADS (2%) в смеси 2,6-лутидин/ACN (1:1 об./об.).

[00468] Лиганд-конъюгированные нити синтезировали с использованием твердой подложки, содержащей соответствующий лиганд. Например, введение углеводного фрагмента/лиганда (например, для GalNAc) на 3'-конце последовательности осуществляли, начиная синтез с помощью твердой подложки с соответствующим углеводом. Аналогичным образом, холестеринный фрагмент на 3'-конце вводили, начиная синтеза на подложке с холестерином. Обычно фрагмент лиганд связывали с *транс*-4-гидроксипролинолом через выбранную связь, как описано в предшествующих примерах, с получением фрагмента гидроксипролинол-лиганд. Затем фрагмент гидроксипролинол-лиганд связывали с твердой подложкой через сукцинатный линкер или превращали в фосфоамидит с помощью стандартных условий фосфорилирования с получением необходимых структурных блоков на

основе конъюгата углевода. Меченные флуорофором siRNA синтезировали на твердой подложке с соответствующим фосфоамидитом, приобретенной у Biosearch Technologies. Полимерную подложку с олеиллитохоловой кислотой (GalNAc)₃ получили в лаборатории при загрузке 38,6 мкмоль/грамм. Полимерную подложку с маннозой (Man)₃ получили в лаборатории при загрузке 42,0 мкмоль/грамм.

[00469] Конъюгирование выбранного лиганда в необходимом положении, например, на 5'-конце последовательности, осуществляли путем связывания соответствующего фосфоамидита с растущей цепью в стандартных условиях фосфоамидитного связывания, если не указано иное. Связывание 0,1 М раствора фосфоамидита в безводном CH₃CN в присутствии активатора 5-(этилтио)-1*H*-тетразола с олигонуклеотидом, связанным на твердой подложке, выполняли в течение 15 минут. Окисление межнуклеотидного фосфита до фосфата выполняли с использованием стандартной смеси йод-вода, как описано (1), или путем обработки смесью *трет*-бутилгидропероксид/ацетонитрил/вода (10: 87: 3), при этом продолжительность окисления конъюгированного олигонуклеотида составляла 10 минут. Фосфоротиоат вводили с помощью окисления фосфита до фосфоротиоата с использованием реагента для переноса серы, такого как DDTT (приобретенного у AM Chemicals), PADS и/или реагента Бокажа. Холестерин-фосфоамидит синтезировали своими силами и использовали в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время связывания для холестерин-фосфоамидита составляло 16 минут.

2. Снятие защиты-I (снятие защиты с нуклеинового основания)

[00470] После завершения синтеза подложку переносили в 100 мл стеклянный флакон (VWR). Олигонуклеотид отделяли от подложки с одновременным снятием защиты с основания и фосфатных групп с помощью 80 мл смеси спиртового аммиака [аммиак:этанол (3:1)] в течение 6,5 часа при 55°C. Флакон быстро охлаждали на льду, а затем смесь на основе спиртового аммиака фильтровали в новый 250 мл флакон. CPG промывали с помощью 2×40 мл порций смеси этанол/вода (1:1 объем/объем). Объем смеси затем сокращали до ~ 30 мл при помощи роторного испарителя. Затем смесь замораживали

на сухом льду и сушили в условиях вакуума на скоростной вакуумной установке.

3. Снятие защиты II (удаление группы 2'-TBDMS)

[00471] Высушенный остаток ресуспендировали в 26 мл триэтиламина, триэтиламинтригидрофторида (TEA.3HF) или пиридина-NF и DMSO (3:4:6) и нагревали при 60°C в течение 90 минут для удаления трет-бутилдиметилсилильных (TBDMS) групп в 2'-положении. Затем реакционную смесь гасили с использованием 50 мл 20 mM ацетата натрия и значение pH доводили до 6,5, при этом хранили в морозильной камере до очистки.

4. Анализ

[00472] Перед очисткой олигонуклеотиды анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), а выбор буфера и колонки зависел от природы последовательности и/или конъюгированного лиганда.

5. Очистка при помощи HPLC

[00473] Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды очищали при помощи препаративной HPLC с обращенной фазой. Неконъюгированные олигонуклеотиды очищали при помощи анионообменной HPLC на колонке с TSKgel, набитой в лаборатории. Буферы представляли собой 20 mM фосфат натрия (pH 8,5) в 10% CH₃CN (буфер А) и 20 mM фосфат натрия (pH 8,5) в 10% CH₃CN, 1 M NaBr (буфер В). Фракции, содержащие олигонуклеотиды полной длины, объединяли, обессоливали и лиофилизировали. Примерно 0,15 OD обессоленных олигонуклеотидов разбавляли в воде до 150 мкл, а затем отмеряли пипеткой в специальные флаконы для CGE- и LC/MS-анализа. Наконец, соединения анализировали при помощи LC-ESMS и CGE.

6. Получение siRNA

[00474] Для получения siRNA эквимоллярные количества смысловой и антисмысловой нитей нагревали в 1x PBS при 95°C в течение 5 минут и медленно охлаждали до комнатной температуры. Целостность дуплекса подтверждали с помощью HPLC-анализа.

Пример 3. Снижение нецелевых эффектов и токсичности *in vivo* с применением некоторых иллюстративных dsRNA

1. Синтез и очистка

[00475] Все олигонуклеотиды получали на синтезаторе MerMade 192 в масштабе 1 мкмоль с применением универсальных или специально созданных подложек. Все фосфорамидиты использовали в концентрации 100 мМ в 100% ацетонитриле или смеси 9:1 ацетонитрил:DMF согласно стандартному протоколу для 2-цианоэтилфосфорамидитов, за исключением того, что время связывания продлевали до 400 секунд. Окисления незадолго до этого образованных связей достигали с применением раствора 50 мМ I₂ в смеси 9:1 ацетонитрил:вода для образования фосфатных связей и 100 мМ DDTT в смеси 9:1 пиридин:ацетонитрил для образования фосфотиоатных связей. После синтеза с удалением диметокситритильной защитной группы колонки инкубировали с 150 мкл 40% водного метиламина в течение 45 минут и раствор переносили посредством вакуумного дренажа в 96-луночный планшет. После повторения инкубации и дренажа с использованием свежей порции водного метиламина планшет, содержащий раствор неочищенных олигонуклеотидов, герметично закрывали и встряхивали при комнатной температуре в течение дополнительных 60 минут до полного удаления всех защитных групп. Осаждение неочищенных олигонуклеотидов завершали посредством добавления в каждую лунку по 1,2 мл смеси 9:1 ацетонитрил:EtOH с последующей инкубацией при -20°C в течение ночи. Затем планшет центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 45 минут, из каждой лунки удаляли супернатант и осадки ресуспендировали в 950 мкл 20 мМ водного NaOAc. Каждый неочищенный раствор в конечном итоге обессоливали посредством колонки для обессоливания GE Hi-Trap (Sephadex G25 Superfine) с использованием воды для элюирования конечных олигонуклеотидных продуктов. Все показатели идентичности и чистоты подтверждали с применением ESI-MS и IEX HPLC соответственно.

2. Температурно-зависимая УФ-спектроскопия

[00476] Исследования плавления проводили при концентрации дуплекса (состоящего из модифицированной антисмысловой нити, спаренной с комплементарной немодифицированной смысловой нитью РНК), составляющей 1 мкМ, в 0,33-кратном PBS (3,3 мМ Na/K фосфатный буфер, рН 7,4, с 46 мМ NaCl и 0,9 мМ KCl) в кварцевых

кюветах с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре Beckman DU800, оснащенном программатором температуры. Каждая кювета содержала 200 мкл раствора образца, покрытого 125 мкл легкого минерального масла. Кривые плавления регистрировали при 260 нм со скоростью нагревания 1°C/мин. от 15 до 90°C. Значения температуры плавления (T_m) рассчитывали по первым производным усредненных кривых нагревания, и полученные значения являлись результатом по меньшей мере двух независимых измерений.

3. Репортерный анализ *in vitro*

[00477] Клетки COS-7 культивировали при 37°C, 5% CO₂ в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Клетки котрансфицировали в 96-луночных планшетах (15000 клеток/лунка) 10 нг репортерных плазмид с люциферазой и siRNA в 10-кратных разведениях от 50 фМ до 50 нМ с применением 2 мкг/мл Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки собирали через 48 ч. после трансфекции для проведения анализа с использованием двойной люциферазы (Promega) в соответствии с инструкциями изготовителя. Нацеленная репортерная плаزمида содержала один идеально комплементарный антисмысловой нити сайт в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) гена люциферазы Renilla. Репортерная плазмида без нацеливания содержала четыре тандемных комплементарных затравочному участку сайта, разделенных 21-28 нуклеотидами, в 3'-UTR гена люциферазы Renilla. Обе плазмиды совместно экспрессировали люциферазу светлячка в качестве контроля трансфекции.

4. Анализ экспрессии генов

[00478] Кριοконсервированные гепатоциты мыши, крысы и человека (Bioreclamation) культивировали при 37°C, 5% CO₂ в среде InVitroGRO CP со смесью антибиотиков Torpedo. Клетки трансфицировали в 96-луночных планшетах (20000 клеток/лунка) 10 нМ siRNA с применением 2 мкг/мл Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя. Клетки собирали через 24 ч. после трансфекции для проведения экстракции РНК с помощью набора miRNeasy (Qiagen) в соответствии

с инструкциями изготовителя, и применяли для получения библиотеки cDNA с использованием набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina), и секвенировали на секвенаторе HiSeq или NextSeq500 (Illumina), все в соответствии с инструкциями изготовителя. Исходные риды RNAseq фильтровали при минимальных средних баллах качества 25 и минимальной остаточной длине 36 с применением fastq-mcf. Отфильтрованные риды выравнивали относительно генома *Rattus norvegicus* (Rnor_6.0) с применением STAR (ультрабыстрое универсальное средство для выравнивания RNA-seq) версии 2.4.2a. Однозначно выровненные риды подсчитывали с помощью featureCounts версии 1.5.0. Дифференциальный анализ экспрессии генов проводили с применением пакета R DESeq2 версии 1.16.1.

5. Доступность кода

[00479] Для анализа данных в отношении RNAseq применяли следующие общедоступные пакеты программного обеспечения. Код доступен по следующим электронным адресам:

fastq-mcf: <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils>,
 STAR Aligner: <https://github.com/alexdobin/STAR>,
 featureCounts: <http://subread.sourceforge.net>,
 DESeq2: <https://github.com/mikelove/DESeq2>.

6. Исследования *in vivo* на мышах и крысах

[00480] Все исследования проводили с применением протоколов в соответствии с местными нормами, нормами штата и федеральными нормами, применимыми и одобренными Институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию (IACUC) в Alnylam Pharmaceuticals.

[00481] В исследованиях фармакодинамики на мышах самкам мышей C57BL/6 (Charles River Laboratories) вводили разовую дозу контроля в виде среды-носителя (0,9% хлорида натрия, солевой раствор) или 0,5 или 1 мг/кг siRNA подкожно в верхнюю часть спины. На 7 или 8 день собирали печени, промывали в холодном солевом растворе, незамедлительно подвергали быстрому замораживанию в жидком азоте и хранили при -80°C для анализа mRNA и siRNA.

[00482] В исследованиях токсичности на крысах самцам крыс Sprague Dawley (Charles River Laboratories) вводили еженедельно три повторные дозы (qw x 3) контроля в виде среды-носителя (0,9% хлорида натрия, солевой раствор) или 30 мг/кг siRNA подкожно в верхнюю часть спины. На 16 день собирали сыворотку для оценки клинической патологии и собирали печени для гистопатологической оценки и для анализа mRNA и siRNA.

7. Количественное определение mRNA и siRNA

[00483] РНК экстрагировали с помощью набора miRNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями изготовителя, превращали в cDNA с помощью набора для обратной транскрипции High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя и оценивали уровни mRNA с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qPCR) с применением ген-специфичных зондов Taqman (Thermo Fisher Scientific) на Roche Light Cycler 480 II с использованием LightCycler 480 Probes Master (Roche).

[00484] Для количественной оценки воздействия siRNA осажденные клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 0,25% Triton X-100, нагревали при 95°C в течение 10 мин., центрифугировали при 14000 об./мин. при 4°C в течение 10 мин. и на супернатантах проводили обратную транскрипцию с применением набора для обратной транскрипции TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя. Проводили qPCR на Roche Light Cycler 480 II с использованием LightCycler 480 Probes Master (Roche) в соответствии с инструкциями изготовителя.

8. Оценка стабильности in vivo у мышей

[00485] Получение образца. К 50 мг замороженной лиофилизированной печени мыши, которой обеспечивали оттаивание при комнатной температуре, добавляли 0,43 мл буфера для расщепления протеиназой К. Буфер для расщепления протеиназой К состоял из 105 мМ Трис HCl, 17,5% Tween 20%, 1,26% Triton X-100, 50 мМ CaCl₂, 3 мМ динатрия EDTA, pH 8,0. Затем образцы быстро перемешивали на вортексе (~20 секунд) и подвергали воздействию

ультразвука в течение 10 минут при комнатной температуре в ультразвуковой ванне. К этому раствору добавляли 20 мкл раствора протеиназы К (Qiagen, кат. № 19133) и образцы перемешивали на вортексе в течение 5 секунд. Образцы инкубировали при 50°C в течение 3 часов со встряхиванием. После этого образцы центрифугировали при 12700 об./мин. в течение 10 минут, из которых собирали 300 мкл супернатанта. Супернатант разделяли на три фракции по 100 мкл и переносили в отдельные лунки 96-луночного планшета. К этим фракциям добавляли 0,9 мл буфера для загрузки лизиса (Phenomenex, кат. № ALO-8579), отрегулированного до pH 5,5, а затем олигонуклеотид внутреннего стандарта (олигомер из 12 нуклеотидов, поли-2'-О-метилуридин) при конечной концентрации 0,5 нг/мл.

[00486] Твердофазная экстракция (SPE) с применением слабого анионообмена (WAX). SPE проводили в 96-луночных планшетах Clarity OTX BLOCK (Phenomenex) с помощью автоматизированного коллектора с положительным давлением (Biotage). Планшет для SPE обрабатывали с помощью 1 мл метанола на лунку и планшет промывали с помощью 1,9 мл уравнивающего буфера (50 mM ацетата аммония, 2 mM азида натрия, pH 5,5). Образцы загружали в лунки для SPE и отбрасывали отработанный поток. После этого сорбент промывали с помощью 1,5 мл x 5 промывочного буфера (50 mM ацетата аммония, 50:50 воды:ацетонитрила, pH 5,5) и элюировали siRNA в чистый глубокий 96-луночный планшет с 2 мл лунками (Thermo scientific) с применением 0,6 мл элюирующего буфера (10 mM EDTA, 10 mM DTT, 100 mM бикарбоната аммония, 50:40:10 воды:ACN:THF, pH 8,8). Образцы выпаривали до сухого состояния в азотном коллекторе Turbovap (Biotage) при 40°C и давлении азота 65 фунтов/кв. дюйм.

[00487] LC-MS и анализ данных. Образцы восстанавливали с помощью 40 мкл воды, предназначенной для LC-MS. Объединяли три повторности образцов с получением конечного объема 120 мкл и подвергали анализу LC-MS. Анализ проводили на масс-спектрометре Thermo QExactive, присоединенном к Dionex Ultimate 3000 UPLC, оснащенном автоматическим дозатором, УФ-детектором и колоночным отделением с регулировкой температуры. Образцы (30 мкл)

подвергали хроматографии на колонке XBridge ВЕН ХР С8, 130 Å, 2,5 мкм, 2,1×30 мм от Waters при 80°C. Элюирование образца осуществляли с применением линейного градиента буфера А (16 mM триэтиламина, 200 mM 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола в воде) до 35% буфера В (метанол) за 4,1 мин. при скорости потока 1 мл/мин. Масс-спектрометр был оснащен источником HESI II и эксплуатировался в режиме определения отрицательных ионов. Анализ данных и деконволюцию сигнала проводили с применением программного обеспечения XCalibur (Thermo Scientific) при взаимодействии с программным обеспечением PromassHR (Novatia LLC).

Результаты

1. Исследования *in vitro*

[00488] Результаты репортерного анализа *in vitro* обобщены в **таблицах 1 и 2**. Как показывают данные в **таблице 1**, иллюстративные паттерны модификаций с помощью гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), например, в положениях 6–7 антисмысловой нити обеспечивают сохранение целевой активности с понижением при этом нецелевой активности *in vitro*.

Таблица 1. Данные репортерных анализов *in vitro* в отношении модификации с помощью GNA в положении 7 антисмысловых нитей

		Целевая IC ₅₀ (нМ)	Нецелевая IC ₅₀ (нМ)
GO1	Исходный уровень (AD-65644)	10,7	>500
	(S)-GNA в AS6 (AD-72841)	2,6	>500
	(S)-GNA в AS7 (AD-72842)	2,5	>500
TTR	Исходный уровень (AD-65958)	0,012	>500
	(S)-GNA в AS6 (AD-72787)	0,006	>500
	(S)-GNA в AS7 (AD-72788)	0,004	>500
AAT	Исходный уровень (AD-77407)	0,013	0,97
	(S)-GNA в AS7 (AD-77412)	0,013	>500

Клетки COS-7 котрансфицировали репортерными плазмидами с люциферазой вместе с siRNA и через 48 ч. проводили люциферазный анализ.

Таблица 2. Данные репортерных анализов *in vitro* в отношении различных дестабилизирующих модификаций в положениях 5, 6, 7 и 8 антисмысловых нитей

Модификация	Положение 5						Положение 6					
	TMP		GO1		F12		TMP		GO1		F12	
	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая
Мод. 1 (S)	-1,12	0,41	-0,11	1,34	0,01	0,64	-0,51	2,28	-0,41	1,52	0,68	0,59
Мод. 1 (R)	-0,24	0,13	-0,48	0,57	0,16	-0,71	-0,36	1,74	-0,82	0,67	0,61	0,81
Мод. 2	-0,51	1,76	-0,61	1,33	-0,29	0,74	-0,38	2,38	-0,79	1,32	0,51	0,98
Мод. 3	0,24	1,60	-0,66	0,67	0,27	0,19	0,11	0,49	-0,13	1,11	0,93	0,24
Мод. 4 (S)	0,02	0,97	-0,04	0,03	-0,51	0,56	-0,16	1,06	Н. о.	Н. о.	0,14	0,07
Мод. 4 (R)	0,02	2,17	-0,04	0,51	1,16	1,12	0,25	2,33	Н. о.	Н. о.	0,68	1,11
Мод. 5	-0,39	4,84	-0,32	0,50	-0,32	1,01	-0,12	4,81	-0,18	0,39	0,29	0,85
Мод. 6	-0,79	0,15	0,45	0,01	0,78	-0,08	-0,98	0,17	0,17	0,05	0,91	0,20
Мод. 7	-1,03	0,25	0,84	0,33	0,13	0,19	-0,85	0,69	Н. о.	Н. о.	0,22	0,08
Мод. 10	Н. о.	Н. о.	0,15	0,06	0,64	0,05	0,25	0,69	Н. о.	Н. о.	1,68	0,08
Мод. 11	-1,03	-0,36	-0,91	1,21	0,17	0,70	-0,63	2,01	-0,50	0,97	-0,55	0,76
Мод. 12	-1,62	1,33	-0,66	1,31	-0,18	0,63	-0,36	2,01	-0,56	1,35	0,03	0,61
Модификация	Положение 7						Положение 8					
	TMP		GO1		F12		TMP		GO1		F12	
	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая	Целевая	Нецелевая
Мод. 1 (S)	0,30	2,21	-0,16	1,42	0,82	0,85	-0,25	2,01	-0,83	1,50	2,77	0,87
Мод. 1 (R)	0,06	2,51	-0,55	0,85	1,56	0,71	0,40	2,45	-0,35	0,76	2,59	0,65
Мод. 2	0,27	2,09	-0,54	1,77	1,62	0,76	-0,06	1,93	-0,56	1,20	2,54	0,77
Мод. 3	-0,03	0,26	-0,95	0,77	0,29	0,61	-0,15	1,61	0,10	1,01	1,10	0,18

Мод. 4 (S)	0,50	3,85	-0,05	-0,03	-0,23	1,09	0,27	1,53	0,22	0,17	0,23	0,71
Мод. 4 (R)	-0,32	0,45	-0,07	0,44	0,28	0,57	-0,02	0,82	0,05	0,38	0,38	0,77
Мод. 5	0,48	4,74	-0,59	1,26	1,32	1,13	-0,14	4,14	0,62	0,47	2,57	1,16
Мод. 6	-0,66	0,76	0,68	0,03	0,23	0,17	-0,79	0,75	0,62	0,14	1,66	0,13
Мод. 7	-0,73	0,87	1,02	0,16	0,57	0,19	-0,49	0,81	0,66	0,10	1,80	0,22
Мод. 10	-0,37	0,66	Н. о.	Н. о.	0,71	0,07	-0,21	0,54	0,06	0,08	0,98	0,21
Мод. 11	-0,19	2,46	0,03	1,48	0,66	0,58	0,24	1,75	-0,11	1,64	2,08	0,70
Мод. 12	0,18	2,02	-0,32	2,07	0,80	0,82	-0,41	1,82	0,11	1,33	2,74	0,49

Все значения трансформированы посредством $\log_2$ и указаны относительно исходной молекулы. Модификации указаны на **фиг. 1**; мод. 11=UNA, мод. 12=C3-спейсер. Значения для исходных молекул являются следующими (оставшийся целевой уровень в процентах): TMP (AD-76463), целевая $22,4 \pm 3,3\%$, нецелевая $17,8 \pm 11,7\%$; GO1 (AD-65644), целевая $41,6 \pm 11,0 \pm$, нецелевая $61,6 \pm 32,0\%$; F12 (AD-71371), целевая $8,8 \pm 1,4\%$, нецелевая $42,7 \pm 4,9\%$.

2. Температурно-зависимая УФ-спектроскопия

[00489] Результаты температурно-зависимой УФ-спектроскопии подытожены в **таблице 3**.

Таблица 3. Значения температуры термического плавления (T_m) некоторых иллюстративных модифицированных dsRNA.

Модификация	Положение 5			Положение 6			Положение 7			Положение 8		
	TMP	GO1	F12	TMP	GO1	F12	TMP	GO1	F12	TMP	GO1	F12
Мод. 1 (S)	67,0	62,2	55,3	63,3	63,1	55,3	62,3	66,1	56,3	63,3	65,2	51,3
Мод. 1 (R)	66,1	60,4	53,4	63,1	62,3	53,4	62,3	64,2	56,4	62,3	63,2	51,4
Мод. 2	64,1	61,2	52,4	59,3	54,4	51,5	58,3	58,3	51,5	58,2	61,2	49,4
Мод. 3	68,0	65,2	56,5	68,0	64,2	57,3	67,1	65,3	57,3	67,2	63,3	57,3
Мод. 4 (S)	72,2	69,6	61,2	72,6	Н. о.	61,3	71,6	69,1	60,7	72,5	68,6	61,2
Мод. 4 (R)	70,5	67,3	59,3	71,0	Н. о.	60,3	70,1	67,6	59,8	71,0	68,2	59,3
Мод. 5	63,7	59,8	51,5	59,9	54,4	51,0	57,8	56,3	51,5	57,3	58,8	48,6

Мод. 6	66,6	61,7	54,3	64,6	63,6	55,2	65,1	64,1	55,2	65,5	61,7	53,8
Мод. 7	67,1	62,7	54,8	65,6	Н. о.	55,8	65,1	64,1	55,2	66,1	60,7	55,3
Мод. 10	Н. о.	65,2	57,2	69,0	Н. о.	58,2	70,0	Н. о.	58,2	69,0	65,7	57,3
Мод. 11	64,2	60,4	51,4	61,1	61,2	52,4	60,1	62,2	53,4	59,2	60,2	49,5
Мод. 12	64,1	61,2	52,4	61,3	55,4	51,4	58,3	57,3	51,5	58,3	59,3	48,5

Модификации указаны на **фиг. 1**; мод. 11=UNA, мод. 12=C3-спейсер. Значения для исходных дуплексов являлись следующими: TMP (AD-76463) 72,0°C; GO1 (AD-65644) 70,0°C, F12 (AD-71371) 60,3°C.

3. Анализ экспрессии генов

[00490] Результаты анализа экспрессии генов *in vitro* с использованием равносильных siRNA показаны на **фиг. 52 и 53** и подытожены в **таблице 4**. Как видно из **таблицы 4**, GNA-модификация в положениях 6–8 (F9) или положениях 5–8 (TTR) антисмысловой нити обеспечивала снижение нецелевой активности *in vitro*.

Таблица 4. Анализ с помощью перехода по положениям

		Мышь		Крыса		Человек	
Мишень	Тестируемое вещество	Число генов, подвергнутых понижающей регуляции (p < 0,05)	Число генов, подвергнутых повышающей регуляции (p < 0,05)	Число генов, подвергнутых понижающей регуляции (p < 0,05)	Число генов, подвергнутых повышающей регуляции (p < 0,05)	Число генов, подвергнутых понижающей регуляции (p < 0,05)	Число генов, подвергнутых повышающей регуляции (p < 0,05)
AAT	Исходный уровень (AD-61444)					100	11
	AS7-GNA (AD-77412)					1	2
GO1	Исходный уровень (AD-65644)			190	160		
	AS7-GNA (AD-72842)			15	6		

TTR	Исходный уровень (AD-64958)			235	144	151	36
	AS3-GNA (AD-72784)			12	18		
	AS4-GNA (AD-72785)			2	1		
	AS5-GNA (AD-72786)			1	2		
	AS6-GNA (AD-72787)			1	0		
	AS7-GNA (AD-72788)			1	0	1	5
	AS8-GNA (AD-72789)			1	0		
F9	Исходный уровень (AD-66573)	179	101				
	AS3-GNA (AD-72826)	277	99				
	AS4-GNA (AD-72827)	492	337				
	AS5-GNA (AD-72828)	450	543				
	AS6-GNA (AD-72829)	1	0				
	AS7-GNA (AD-72830)	1	0				
	AS8-GNA (AD-72831)	1	0				

Гепатоциты мыши (F9), гепатоциты крысы (GO1 и TTR) или гепатоциты человека (AAT) трансфицировали с помощью siRNA (10 мкМ; вводили дозу AD-72786 при 50 мкМ) и собирали РНК через 24 ч. для секвенирования РНК.

4. Исследования *in vivo* на мышах и крысах

[00491] Результаты исследований *in vivo* обобщены в **таблицах 5–7**. Как можно увидеть, модификация с помощью GNA в положении 7 антисмысловой нити обеспечивает сохранение эффективности *in vivo* (**таблица 5**) и снижение токсичности *in vivo* (**таблицы 6 и 7**). В **таблице 8** показаны данные репортерных анализов *in vitro* в отношении различных дестабилизирующих модификаций в положениях 5, 6, 7 и 8 антисмысловых нитей

Таблица 5. Данные в отношении фармакодинамики у мышей

		% mRNA, оставшейся ко дню 8
GO1	Исходный уровень	41
	(S)-GNA в пол. 7 AS	24
TTR	Исходный уровень	40
	(S)-GNA в пол. 7 AS	47
AAT	Исходный уровень	30
	(S)-GNA в пол. 7 AS	29
Значения представляют собой оставшийся уровень mRNA (GO1) или белка (TTR, AAT) относительно контроля PBS в D7 в печени или кровотоке соответственно. Все значения представляет собой результаты одного эксперимента с n=3 животных		

[00492] Мышам вводили однократную дозу siRNA при 1 мг/кг (GO1 и AAT) или 0,5 мг/кг (TTR), и нокдаун mRNA в печени оценивали на 7 или 8 день.

Таблица 6. Данные в отношении токсичности у крыс

		ALT (% контрол я)	AST (% контрол я)	ALP (% контрол я)	TBILI (% контрол я)	TBA (% контрол я)	GLDH (% контрол я)
GO 1	Исходный уровень (AD- 65644)	134	178	299	350	373	850
	(S)-GNA в AS7 (AD- 72842)	122	150	195	150	181	883
TT R	Исходный уровень (AD- 65958)	190	258	225	331	460	1160
	(S)-GNA в AS6 (AD- 72787)	103	82	104	114	146	123

Крысам вводили три дозы siRNA при 30 мг/кг еженедельно и оценивали тесты в отношении функции печени через 24 ч. после последней дозы (16 день).

Таблица 7. Данные в отношении токсичности у крыс

Группа	0,9% NaCl	Исходный GO1 (AD- 65644)	GO1 GNA7 (AD- 72842)	Исходный TTR (AD- 64958)	TTR GNA7 (AD-72788)
ПЕЧЕНЬ					
Дегенерация: гепатоцеллюлярная					
Минимальная	0	0	3	0	0
Легкая	0	3	1	2	0
Средняя	0	1	0	2	0
Всего	0	4	4	4	0
Фиброз					
Минимальный	0	1	0	0	0
Легкий	0	2	0	0	0
Всего	0	3	0	0	0
Гиперплазия: желчные протоки					
Минимальная	0	0	0	1	0
Всего	0	0	0	1	0
Гипертрофия/гиперплазия : клетки Купфера					
Минимальная	0	3	0	0	0
Легкая	0	1	0	0	0
Всего	0	4	0	0	0
Признаки повышенной частоты митоза: гепатоцеллюлярный					
Минимальная	0	3	2	0	0
Легкая	0	0	0	3	0
Средняя	0	0	0	1	0
Всего	0	3	2	4	0
Некроз, коагуляционный: гепатоцеллюлярный					
Минимальный	0	0	0	1	0

ая					
Всего	0	0	0	1	0
Некроз, одиночная клетка: гепатоцеллюлярный					
Минимальная	0	0	3	1	1
Легкая	0	3	0	3	0
Средняя	0	1	0	0	0
Всего	0	4	3	4	1
Вакуолизация: гепатоцеллюлярная					
Минимальная	1	0	3	0	3
Легкая	0	3	1	4	0
Средняя	0	1	0	0	0
Всего	1	4	4	4	3

Крысам вводили три дозы siRNA при 30 мг/кг еженедельно и оценивали выявленные с помощью микроскопа наблюдаемые признаки в печени через 24 ч. после последней дозы (16 день).

Таблица 8. Данные репортерных анализов *in vitro* в отношении различных дестабилизирующих модификаций в положениях 5, 6, 7 и 8 антисмысловых нитей

Модификация	Положение 5				Положение 6			
	GO1		TTR		GO1		TTR	
	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.
Мод. 1 (S)	0,70 ^a	0,20	0,82 ^a	0,32	0,36	0,05	0,64 ^a	0,17
Мод. 2					0,36	0,09		
Мод. 3	0,19 ^a	0,15	0,27	0,06	0,19	0,08		
Мод. 5	0,28	0,05			0,19	0,09		
Мод. 6	0,24 ^a	0,09	0,24	0,06	0,10	0,05	0,21	0,03
Мод. 7	0,28 ^a	0,11	0,62	0,05				
Мод. 10	0,29 ^a	0,09	0,37	0,04	0,25	0,09	0,20	0,02
Мод. 11	0,59	0,15			0,24	0,09		
Мод. 12					0,73	0,51		
Модификация	Положение 7				Положение 8			
	GO1		TTR		GO1		TTR	
	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.	Целевая	Ст. откл.
Мод. 1 (S)	0,25 ^b	0,21	0,34 ^a	0,14	0,43	0,08	0,44	0,28
Мод. 2	0,51	0,05						

Мод. 3	0,12 ^a	0,05	0,20	0,02				
Мод. 5	0,38	0,20						
Мод. 6	0,18 ^a	0,13	0,13	0,04				
Мод. 7	0,22 ^a	0,18	0,20	0,02				
Мод. 10	0,18 ^a	0,11	0,17	0,05				
Мод. 11	0,19	0,03			0,80	0,39		
Мод. 12	0,65	0,30						

Значения представляют собой оставшийся уровень mRNA (GO1) или белка (TTR) относительно контроля PBS в D7 в печени или кровотоке соответственно. Исходный уровень нокдауна при указанной дозе являлся следующим: 0,255^c ± 0,167 для GO1; 0,362^a ± 0,162 для TTR. Все значения представляют собой результаты одного эксперимента с n=3 животных, если не указано иное с помощью верхнего индекса: a=среднее для 2 отдельных экспериментов, каждый с n=3 животных; b=среднее для 3 отдельных экспериментов, каждый с n=3 животных; c=среднее для 4 отдельных экспериментов, каждый с n=3 животных. Модификации указаны на **фиг. 1**; мод. 11=UNA, мод. 12=C3-спейсер.

Таблица 9. Последовательности иллюстративных siRNA

Дуплекс siRNA	Сопровождающая (5'–3')	Направляющая (5'–3')	Мишень
AD-65644	g•a•auguGaaAGucaucgac aa (L)	u•U•gucGaUGacuuUcAcau uc•u•g	GO1
AD-72840	g•a•auguGaaAGucaucgac aa (L)	u•U•gu <u>C</u> GaUGacuuUcAcau uc•u•g	GO1
AD-72841	g•a•auguGaaAGucaucgac aa (L)	u•U•guc <u>G</u> aUGacuuUcAcau uc•u•g	GO1
AD-72842	g•a•auguGaaAGucaucgac aa (L)	u•U•gucG <u>A</u> UGacuuUcAcau uc•u•g	GO1
AD-72843	g•a•auguGaaAGucaucgac aa (L)	u•U•gucGa <u>T</u> GacuuUcAcau uc•u•g	GO1
AD-64958	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•auaGagcaagaAcAcug uu•u•u	TTR

AD-72784	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U• <u>A</u> uaGagcaagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-72785	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•a <u>T</u> aGagcaagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-72786	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•au <u>A</u> GagcaagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-72787	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•aua <u>G</u> agcaagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-72788	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•auaG <u>A</u> gcaagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-72789	a•a•caguGuUCUugcucuau aa (L)	u•U•auaGa <u>G</u> caagaAcAcug uu•u•u	TTR
AD-66573	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•cauCaacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72826	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•CauCaacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72827	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•cAuCaacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72828	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•caTCaacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72829	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•cauCaacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72830	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•cauCAacauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-72831	<u>u•q•gaagCaGUAuguugaug</u> <u>ga (L)</u>	<u>u•C•cauCaAcauacUgCuuc</u> <u>ca•a•a</u>	F9
AD-76463	<u>c•u•gquaUuUCCuagqguac</u> <u>aa (L)</u>	<u>u•U•quaCccuaggaAaUacc</u> <u>ag•a•q</u>	TMP
AD-71371	<u>a•a•uaaaGuGCUuugaaaac</u> <u>gu (L)</u>	<u>a•C•quuUucaaaqcAcUuua</u> <u>uu•q•a</u>	F12
AD-61444	c•u•ucuaauGAuugaacaa aa (L)	u•U•uUgUuCaAucaUuAaGa Ag•a•c	AAT
AD-75994	c•u•ucuaauGAuugaacaa aa (L)	u•U•uUg <u>T</u> uCaAucaUuAaGa Ag•a•c	AAT
AD-75995	c•u•ucuaauGAuugaacaa	u•U•uUgU <u>T</u> CaAucaUuAaGa	AAT

	aa (L)	Ag•a•c	
AD-77407	c•u•ucuuAaUGAuugaасаа	u•U•uuguuсааuсаUuAаgа	AAT
	aa (L)	ag•a•c	
AD-77412	c•u•ucuuAaUGAuugaасаа	u•U•uugu <u>T</u> сааuсаUuAаgа	AAT
	aa (L)	ag•a•c	

Заглавные, строчные и заглавные жирные подчеркнутые буквы представляют собой модификации сахаров 2'-F, 2'-OMe и (S)-GNA соответственно в аденозине, цитозине, гуанозине и уридине. (L) представляет собой три-N-ацетилгалактозаминный лиганд. Фосфотиоатные связи отмечены символом "●".

5. Стабильность *in vivo* у мыши

[00493] Результаты исследований подытожены на **фиг. 32A–32C**. Как видно на **фиг. 32A и 32B**, на трансляцию *in vivo* влияет метаболическая стабильность антисмысловой нити, где имеет место сильная корреляция между количеством полноразмерной антисмысловой нити, оставшейся в печени, и целевым нокдауном.

6. IC₅₀

[00494] Результаты исследований с применением иллюстративных dsRNA, нацеливающихся на TTR или F9, показаны на **фиг. 50** (TTR) и **фиг. 51** (F9).

7. Другие модификации

[00495] Результаты исследований с применением иллюстративных dsRNA, содержащих другие нарушающие термостабильность модификации, показаны на **фиг. 54 и 55**. Как можно видеть, все тестированные модификации способны обеспечивать сохранение активности, подобной исходной.

Пример 4. Влияние гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) на структуру и функцию siRNA

[00496] Химические модификации в siRNA-дуплексах необходимы для стабилизации этих молекул против разрушения нуклеазами, для облегчения их поступления в клетки и для воздействия на образование активного RISC, а также для сайленсинга мишени, опосредованного RNAi. Нарушающие термостабильность модификации, введенные в определенные положения siRNA-дуплекса, могут приводить к увеличению эффективности путем усиления сдвига нити

и/или диссоциации смысловой нити при включении в комплекс RISC. В настоящем исследовании авторы настоящего изобретения изучали простой ациклический аналог нуклеиновой кислоты с тремя атомами углерода, гликолевую нуклеиновую кислоту, (GNA), в контексте некоторых иллюстративных дуплексов siRNA.

1. Анализ термического плавления (T_m) (S)-GNA-содержащих дуплексов siRNA

[00497] Результаты однократного введения нуклеотида GNA в отношении стабильности дуплекса siRNA показаны на **фигуре 33**. Нуклеотиды GNA вводили либо в смысловую, либо в антисмысловую нить в указанном положении. Синими и красными точками отмечены пары оснований A:T и G:C соответственно. Измерения проводили в 0,25x PBS при концентрации дуплекса, составляющей 1 мкМ. Каждая точка данных представляет собой среднее для двух измерений. На нижней левой вкладке показаны средние изменения температуры плавления после введения одного нуклеотида (S)-GNA в любое положение дуплекса ("липкие" концы исключены из данного анализа). Как можно видеть, введение GNA приводило к зависимому от положения нарушению термостабильности полученного дуплекса. Степень дестабилизации наиболее зависела от нуклеотида; при этом замена нуклеотида A или U приводила к значительно меньшему ΔT_m по сравнению с заменой на GNA нуклеотидов G или C.

2. Кристаллическая структура дуплексов РНК, содержащих нуклеотиды (S)- и (R)-GNA

[00498] Результаты анализа кристаллической структуры дуплексов РНК с модификацией кристаллических структур дуплексов РНК, модифицированных с помощью обоих стереоизомеров GNA-T, показаны на **фиг. 34А-34F**. Среди фигур на **фиг. 34А** продемонстрированы различия во внутринитевых расстояниях P...P как следствие введения остатков GNA-T (атомы углерода выделены зеленым) в дуплексе олигомера из 8 нуклеотидов РНК. **Фиг. 34В** представляет собой пример пары оснований (S)-GNA-T:РНК-А, демонстрирующей конформацию повернутого нуклеинового основания в случае нуклеотида GNA (стрелка). На **фиг. 34С** показано, что нуклеотиды GNA принимают как гош-, так и антиконформации в пределах структур. На **фиг. 34D** показано, что остатки (R)-GNA-T

нарушают дуплекс РНК и геометрию спаривания в большей степени, чем остатки (S)-GNA-T. Наложение пар оснований A:U и G:A, фланкирующих (S)-GNA-T (зеленый):РНК-A и (R)-GNA-T (желтый):РНК-A в двух дуплексах олигомерах из 12 нуклеотидов приводит к разрыву прилегающей пары A:U в (R)-GNA-T-модифицированном олигомере из 12 нуклеотидов (стрелка). На **фиг. 34Е** показаны глобальные структуры дуплексов РНК, включающих как (S)-, так и (R)-изомеры GNA, в которых выделены фосфатные остовы. Два изомера по разному расположены в глобальной структуре РНК и приводят к легкому перекручиванию в дуплексе, содержащем (R)-изомер (стрелка). На **фиг. 34F** показано, что остаток (S)-GNA-T может естественным образом и с оптимальной геометрией заменять нуклеотид РНК в положении 7 направляющей нити РНК, связанной с Ago 2.14 человека. Нить РНК предполагает перекручивание в участке, который связан с Ile-365, и это приводит к нарушению укладки оснований нуклеотидов 6 и 7.

[00499] Как можно видеть, кристаллические структуры дуплексов РНК, включающие либо (S)-, либо (R)-GNA, демонстрируют эластичность гликолевого остова в структуре дуплекса, что позволяет нуклеиновым основаниям из остатков GNA-T принимать неканоническую пару оснований с повернутой конформацией. Последний результат дополнительно подтвержден с помощью экспериментов по перекрестному спариванию с нуклеотидами isoC и isoG (рассмотренными ниже). Кроме того, введение (R)-изомера, предпочтительно дуплекса, закрученного против часовой стрелки, приводило к более сильному нарушению термостабильности и к большему нарушению общей структуры дуплекса.

3. Перекрестное спаривание (S)-GNA с нуклеотидами isoC и isoG РНК

[00500] Измеряли термостабильность (S)-GNA с помощью нуклеотидов isoC и isoG РНК в иллюстративной dsRNA. Результаты подытожены в **таблице 10**. Структуры isoC и isoG показаны на **фиг. 35**.

Таблица 10. Данные в отношении термического плавления для нуклеотидов изоцитидина и изогуанозина*

5'-UACAGU X UAUGU-3' 3'-AUGUCA Y AUACA-5'						
X:Y	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	X:Y	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	ΔΔT _m (°C)
C:G	51,2	0,0	isoC:isoG	48,7	-2,5	-
C:isoG	48,5	-2,7	isoC:G	35,8	-15,4	-
<u>C</u> :G	34,4	-16,8	C:isoG	39,7	-11,5	+5,3
C: <u>G</u>	39,2	-12,1	isoC:G	40,7	-10,5	+1,6

*Заглавные жирные подчеркнутые буквы представляют нуклеотиды (S)-GNA. Все значения являются средними из двух независимых измерений при концентрации дуплекса, составляющей 2 мкМ в буфере 1x PBS.

4. Активность siRNA *in vitro*

[00501] Результаты влияния положения одной нуклеотидной замены (S)-GNA в отношении активности, направленной на сайленсинг *in vitro*, при концентрации 10 нМ siRNA показаны на **фиг. 36**. Нуклеотид в указанном положении направляющей или сопровождающей нити заменен на соответствующий нуклеотид GNA. Как можно видеть, введение одного нуклеотида или пары оснований (S)-GNA в затравочные или дополнительные области дуплексов siRNA приводили к получению сходных уровней нокдауна mRNA *TTR in vitro*.

[00502] Кривые IC₅₀ иллюстративной dsRNA, нацеливающейся на TTR, показаны на **фиг. 50**, и кривые IC₅₀ иллюстративной dsRNA, нацеливающейся на фактор IX (также называемый F9), показаны на **фиг. 51**.

5. Активность siRNA *in vivo*

[00503] Результаты нокдауна TTR у мышей с (S)-GNA-модифицированными дуплексами siRNA при дозе 2,5 мг/кг показаны на **фиг. 37A и 37B**. Уровни сайленсинга генов поддерживали *in vivo* с помощью иллюстративной siRNA, модифицированной с применением одного нуклеотида (S)-GNA в сопровождающей или направляющей нити. Модификация с применением одной пары оснований (S)-GNA обеспечивала склонность к более низкой эффективности и продолжительности эффекта.

Пример 5. Отбор хорошо переносимых иллюстративных конъюгированных с GalNA siRNA посредством скрининга в отношении опосредованных RNAi нецелевых эффектов в исследованиях токсичности у грызунов

1. Уход и использование лабораторных животных

[00504] Все исследования проводили с применением протоколов в соответствии с местными нормами, нормами штата и федеральными нормами, применимыми и одобренными Институциональными комитетами по уходу за животными и их использованию (IACUC) в Alnylam Pharmaceuticals. Тестируемые вещества разбавляли с помощью 0,9% NaCl для достижения подходящих концентраций для введения дозы и дозу вводили подкожно в верхнюю часть спины самцов крыс Sprague Dawley (возрастом 6–8 недель) или самцов мышей CD-1 (возрастом 6–8 недель) в объеме дозы 5 мл/кг при N=3 животных/группа. Рандомизацию проводили с применением алгоритма разделения в Pristima® Suite (Hybion), что позволяет избегать отклонений в значении среднего веса тела группы. Исследователи были в курсе распределения групп во время эксперимента или при оценке исхода.

2. Лабораторная диагностика

[00505] Цельную венозную кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки крови (BD Microtainer) и обеспечивали сворачивание при комнатной температуре в течение 30 мин. перед центрифугированием при 3000 об./мин. (1489 g) в течение 10 минут при 4°C. Затем сыворотку разделяли на аликвоты и хранили при – 80°C перед проведением анализов. Биохимические показатели сыворотки крови анализировали с применением анализатора для биохимического анализа крови AU400 (Beckman Coulter– Бреа, Калифорния, США), с помощью реагентов, предоставленных Beckman Coulter, Randox, и Sekisui Diagnostics. Отличия между средними значениями групп оценивали в отношении статистической значимости с применением однофакторного ANOVA в GraphPad Prism 7.

3. Гистопатология

[00506] Всех животных подвергали эвтаназии согласно стандартным технологическим инструкциям Alnylam и собирали ткани, представляющие интерес. Все ткани фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (10% NBF) за 72 ч. до

стандартной обработки с применением TissueTek VIP 6A1 (Sakura). Ткани подравнивали, заливали в парафиновых блоках, делали срезы при четырех микронах, окрашивали с помощью гематоксилина и эозина (H&E) с применением TissueTek Prisma A1D (Sakura) и заклеивали покровными стеклами с применением TissueTek Glass g2 (Sakura). Два среза из каждой печени исследовали под микроскопом не слепым образом с последующей слепой оценкой для подтверждения слабовыраженных наблюдаемых признаков. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака оценивали в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

4. Синтез мономеров и олигонуклеотидов

[00507] Все олигонуклеотиды синтезировали и характеризовали, как описано ранее (Nair, J.K. et al. J Am Chem Soc, 136, 16958–16961; Schlegel, M.K., et al. J Am Chem Soc, 139, 8537–8546). Фосфорамидитные мономеры 2'-F-, 2'-OMe- и LNA-модифицированного аденозина (A), цитидина (C), гуанозина (G), уридина (U), а также инвертированные фосфорамидитные мономеры с удаленным азотистым основанием (iB) получали из коммерческих источников. Синтез мономеров GNA-фосфорамидитов был ранее описан (Schlegel, M.K., et al. J Am Chem Soc, 139, 8537–8546 и ссылки в нем). Фосфорамидиты 5'-дезоксипентозин-5'-(4-морфолинил)уридин, 5'-дезоксипентозин-5'-(4-морфолинил)цитидин и 5'-дезоксипентозин-5'-(4-морфолинил)уридин синтезировали в лаборатории. Показатели идентичности и чистоты всех олигонуклеотидов подтверждали с применением ESI-LC/MS и IEX HPLC соответственно. Последовательности siRNA, применяемых в данном примере, показаны в **таблице 11**.

Таблица 11. Иллюстративные siRNA, применяемые в данном примере.

Дуплекс siRNA	Сопровождающая (5'-3')	Направляющая (5'- 3')	Мишень
siRNA-1 (AD-58641)	U•g•AcAaAaUAACUcAc UaUaA(L)	u•U•aUaGuGaGuuaUuU uGuCa•a•u	C5
siRNA-2 (AD-65421)	G•u•gcacUuCGCuucac cucua(L)	u•A•gagGugaagcgAaG ugcac•u•u	HBV

siRNA-3 (AD-61102)	G•g•UuAaCaCGUuUuAg AuCaA(L)	u•U•gAuCuAaAacgUgU uAaCc•a•g	Скремблиров анный
siRNA-4 (AD-57727)	A•a•CaGuGuUCUuGcUc UaUaA(L)	u•U•aUaGaGcAagaAcA cUgUu•u•u	TTR
siRNA-5 (AD-65644)	g•a•auguGaaAGucauc gacaa(L)	u•U•gucGaUGacuuUcA cauuc•u•g	G01
siRNA-6 (AD-60940)	C•u•GgUaUuUCCuAgGg UaCaA(L)	u•U•gUaCcCuAggaAaU aCcAg•a•g	TMP
siRNA-7 (AD-77407)	c•u•ucuuAaUGAuugaa caaaa(L)	u•U•uuguucaaUaUaA agaag•a•c	AAT
siRNA-8 (AD-58643)	A•a•GcAaGaUAUuUuUa UaAuA(L)	u•A•uUaUaAaAuaUcU uGcUu•u•u	C5

Заглавные, строчные и заглавные жирные подчеркнутые буквы представляют собой модификации сахаров 2'-F, 2'-OMe и (S)-GNA соответственно в аденозине, цитозине, гуанозине и уридине. (L) представляет собой три-N-ацетилгалактозаминный лиганд. Фосфотиоатные связи отмечены символом "•".

5. Количественное определение уровней siRNA в цельной печени и в ассоциации с Ago2

[00508] Уровни siRNA в печени и в ассоциации с Ago2 (RISC-загруженной) подсчитывали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) с применением структуры "петля на стебле" (Parmar, R. et al. Chembiochem, 17, 985-989).

6. Анализ RNAseq и биоинформатика

[00509] Печени крыс собирали через 24 ч. после введения однократной дозы 50 мг/кг GalNAc-siRNA и быстро замораживали. Гепатоциты крысы (BioreclamationIVT) трансфицировали 10 нМ GalNAc-siRNA с применением Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя и собирали через 24 ч. после трансфекции. Гепатоциты крыс не тестировали в отношении заражения микоплазмой. Экстрагированную с помощью набора miRNeasy (Qiagen) РНК применяли для получения библиотеки cDNA с использованием набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina) и секвенировали на секвенаторе HiSeq или NextSeq500 (Illumina), все в соответствии с инструкциями

изготовителя. Исходные риды RNAseq фильтровали при минимальных средних баллах качества 25 и минимальной остаточной длине 36 с применением fastq-mcf. Отфильтрованные риды выравнивали относительно генома *Rattus norvegicus* (Rnor_6.0) с применением STAR (ультрабыстрое универсальное средство для выравнивания RNA-seq) с параметрами по умолчанию. Однозначно выровненные риды подсчитывали с помощью featureCounts. Дифференциальный анализ экспрессии генов проводили с применением пакета R DESeq2.

7. Доступность кода

[00510] Применяли общедоступный пакет DESeq2 R для анализа данных RNAseq.

Результаты

1. Блокирование загрузки RISC антисмысловой нити обеспечивает снижение гепатотоксичности

[00511] Эффективная загрузка RISC и активность малых триггеров RNAi зависит от присутствия монофосфатного фрагмента на 5'-конце. В то время как эндогенные miRNA обычно содержат 5'-монофосфат как результат своего биосинтеза, считается, что экзогенные siRNA зависят от фосфорилирования киназами после внутриклеточного поглощения. Для характеристики взаимосвязи загрузки RISC и гепатотоксичности, наблюдаемой с применением подгруппы модифицированных GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на грызунах (таблица 11), кэпировали 5'-концы дуплексов с ранее установленной гепатотоксичностью (фиг. 38A) с помощью трех типов модификаций нуклеотидов, сконструированных для затруднения 5'-фосфорилирования и, таким образом, загрузки RISC: 5'-инвертированные с удаленным азотистым основанием (iB), 5'-дезоксид-5'-(4-морфолинил) или 5'-дезоксид нуклеотиды. Такие кэпированные siRNA, дефектные в отношении загрузки RISC, характеризовались содержанием PS, 2'OMe и 2'F, сходным с их RNAi-активными аналогами, которые были идентифицированы в предыдущих скрининговых исследованиях токсичности на крысах с краткосрочным повторяющимся введением дозы как гепатотоксичные, и их конструировали к различным целевым mRNA с ожидаемой целевой активностью у грызунов или без нее.

[00512] Эффекты блокирования загрузки RISC в отношении гепатотоксичности тестировали при токсических дозах у грызунов. Крысы или мыши получали 5–9 раз в неделю или через день дозы 30–100 мг/кг, которые представляли 2–3 log увеличение диапазона фармакологической дозы. Модификации с блокированием фосфорилирования с 5'-кэппированием антисмысловой нити обеспечивали снижение загрузки RISC (**фиг. 39А**) и нокдауна целевой mRNA (**фиг. 39В**) по сравнению с исходными siRNA. Во всех исследованиях отсутствовали значительные отличия в концентрациях в печени между RNAi-активными и RNAi-неактивными siRNA с одинаковой последовательностью и химической структурой остова (**фиг. 38В**), что подтверждает то, что система эндолизосом и внутриклеточные белки подвергались воздействию эквивалентных количеств каждой siRNA независимо от их способности загрузки RISC. Несмотря на эквивалентные показатели воздействия в печени, блокирование загрузки RISC известных гепатотоксичных siRNA приводило к устранению уровней повышения ферментов в печени (**фиг. 38С и 39С**) и показателей большинства выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени, включая фиброз, некроз одиночных клеток и гепатоцеллюлярную дегенерацию как у мышей, так и у крыс (**фиг. 38D и таблица 12**). Важно отметить, размещение модификаций, которые обеспечивают блокирование загрузки RISC, на 5'-конце смысловой нити по отдельности (**фиг. 40А–40С**) или в нетоксичном наборе GalNAc-siRNA (**фиг. 41А–41С**) не оказывало эффектов в отношении уровней повышения ферментов в печени или выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени (**таблицы 13 и 14**), что указывает на то, что такие 5'-кэп-структуры, вероятно, не влияют на внутриклеточный трафик siRNA или вводят дополнительный потенциал безопасности.

Таблица 12. Гистологические наблюдаемые признаки с применением RNAi-активных и RNAi-неактивных GalNAc-siRNA

	Крыса										Мышь			
	siRNA-1		siRNA-2		siRNA-3		siRNA-4		siRNA-5		siRNA-6		siRNA-7	
	-	iB	-	iB	-	iB	-	Mo	-	Mo	-	iB	-	Mo
Блокирование загрузки RISC														
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	1-3				3		2-3		2		3-4		1	
Некроз, единичная клетка, гепатоцел.	1-3		1-2		3		1	2			1-2		1-2	
Некроз, коагуляционный, гепатоцел.														
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный											1-3			
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	1-2	1	1	1	3		1-3	1-2	1		1-2	1		
Гиперплазия кл. Купфера/ клет. инф.	1		2		2-3				2		1-3		1	
Гиперплазия, желчные протоки					1						1-3			
Фиброз									3					
Повышенные показатели митоза	1						1				1			
Вакуолизация, клетки Купфера														

[00513] В таблице 12 показано, что блокирование загрузки RISC снижает гепатотоксичность. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

Таблица 13. Гистологические наблюдаемые признаки с применением GalNAc-siRNA с 5'-модификациями с блокированием RISC в смысловой нити

5'-модификация смысловой нити	Крыса		
	siRNA-1		
	-	iB	Mo
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	1-4	2-3	2-3
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный	2-3	2-3	2
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный			1
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный			
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	1-2	2-3	1-2
Гиперплазия клетки Купфера/ клет. инфильтраты	1-3	1	1
Гиперплазия, желчные протоки	1		
Фиброз			
Повышенные показатели митоза	1-2	1-2	1
Вакуолизация, клетки Купфера			

[00514] В таблице 13 показаны эффекты 5'-модификаций смысловой нити в отношении гепатотоксичности токсичных GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на крысах. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень. iB, инвертированный с удаленным азотистым основанием; Mo, морфолино.

Таблица 14. Гистологические наблюдаемые признаки с применением нетоксичной GalNAc-siRNA с 5'-модификациями с блокированием RISC как в смысловой, так и в антисмысловой нити

	Крыса		
	siRNA-8		
Блокирование загрузки RISC	-	iB	Mo
Дегенерация, гепатоцеллюлярная			
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный			
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный			
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный			
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	1	1	1
Гиперплазия кл. Купфера/ клет. инфильтраты	1	1	1
Гиперплазия, желчные протоки			
Фиброз			
Повышенные показатели митоза			
Вакуолизация, клетки Купфера			

[00515] В таблице 14 показаны эффекты 5'-модификаций смысловой нити в отношении гепатотоксичности нетоксичных GalNAc-siRNA в исследованиях токсичности на крысах. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень. iB, инвертированный с удаленным азотистым основанием; Mo, морфолино.

[00516] Эти исследования демонстрируют, что гепатотоксичность подгруппы GalNAc-siRNA у грызунов зависит от загрузки RISC антисмысловой нити, но не зависит от связанных с химической структурой siRNA механизмов, имеющих место до загрузки RISC, таких как нарушение системы эндолизосом или нежелательное связывание внутриклеточных белков с относительно гидрофобными модификациями остова, такими как PS или 2'F.

2. Изменение химических модификаций siRNA не обеспечивает уменьшение гепатотоксичности.

[00517] С целью дополнительного снижения риска потенциального вклада содержания 2'F и 2'OMe в гепатотоксичность siRNA тестировали два различным образом модифицированных варианта модельной гепатотоксичной siRNA в исследованиях токсичности на грызунах: вариант с высоким содержанием 2'-F (48% 2'F и 52% 2'OMe) и вариант с низким содержанием 2'-F (21% 2'F и 79% 2'OMe) (фиг. 42A). Оба соединения имели идентичную последовательность и содержание PS и сохраняли сильную активность, направленную на сайленсинг (фиг. 43). Дозы этих

соединений еженедельно вводили крысам при 100 мг/кг и мышам при 200 мг/кг на протяжении курса из девяти недель. С применением этой парадигмы частого введения дозы показатели воздействия в печени (фиг. 42В) и загрузка RISC (фиг. 42С) были сравнимы с siRNA с низким и высоким содержанием 2'-F в конце каждого исследования. Аналогично, уровни повышения ферментов в печени (фиг. 42D) и показатели выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени (фиг. 42Е и таблица 15) были не зависимы от количества 2'-F- или 2'-ОМе-модификаций в данной последовательности у обоих видов грызунов. Эти данные обеспечивают дополнительные факты в отношении химических модификаций siRNA как движущей силы гепатотоксичности GalNAc-siRNA у грызунов.

Таблица 15. Гистологические наблюдаемые признаки с применением GalNAc-siRNA с высоким или низким содержанием 2'F

	Крыса		Мышь	
	siRNA-6			
	2'F-высокое	2'F-низкое	2'F-высокое	2'F-низкое
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	3-4	2-3		1
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный	1-2	1-2	1	1
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный				
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный	1-3	2-3		
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	1-2	2-3		
Гиперплазия кл. Купфера/ клет. инфильтраты	1-3	1-2		
Гиперплазия, желчные протоки	1-3	1		
Фиброз		1		
Повышенные показатели митоза	1	1		
Вакуолизация, клетки Купфера		2-3		

[00518] В таблице 15 показано, что изменение химических модификаций siRNA не обеспечивает уменьшение гепатотоксичности. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1-5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

3. Обращение активности, направленной на загрузку RISC антисмысловой нити обеспечивает снижение гепатотоксичности

[00519] Поскольку механизмы, связанные с химической структурой siRNA, имеющие место перед загрузкой RISC, по

видимому, не имеют значительного влияния в отношении гепатотоксичности у грызунов, акцент заключался в различении опосредованных RNAi нецелевых эффектов от нарушения эндогенных путей RNAi. Стратегия обеспечивала возможность загрузки RISC siRNA путем сохранения химической структуры и последовательности siRNA неизменными, но предотвращала связывание загруженного siRNA RISC с потенциальными нецелевыми mRNA. Для достижения этого активность RNAi после загрузки RISC блокировали с применением GalNAc-конъюгированных коротких одонитевых олигонуклеотидов, комплементарных антисмысловой нити siRNA, известных как соединения REVERSIR™, в двух типах исследований токсичности на крысах: предупреждение и обработка (фиг. 44A).

[00520] В исследовании с предупреждением предварительно вводили дозу молекул REVERSIR™, комплементарных антисмысловой нити гепатотоксичной siRNA или контрольной скремблированной последовательности REVERSIR™ той же длины и химического состава при высокой фармакологической дозе (3 или 10 мг/кг) либо за 24 ч. до первой дозы siRNA, либо за 24 ч. до первой и второй дозы siRNA. В исследовании с обработкой дозу соединений REVERSIR™ вводили при высокой фармакологической дозе (3 или 10 мг/кг) через 24 ч. после последней дозы siRNA. Дозу гепатотоксичных GalNAc-siRNA вводили еженедельно (три раза) или через день (шесть раз) при 30 мг/кг. С помощью биоинформатики подтверждено, что комплементарные и скремблированные молекулы REVERSIR™ не демонстрируют полную комплементарность с какой-либо из экспрессируемых в печени miRNA, которые потенциально можно блокировать с помощью соединений REVERSIR™.

[00521] Обработка с помощью REVERSIR™ до или после введения siRNA обеспечивала снижение целевого нокдауна (фиг. 45), но не влияла на уровни siRNA в печени (фиг. 44B) или загрузку RISC (фиг. 44C). Однако комплементарные соединения REVERSIR™ (RVR-1, RVR-4 или RVR-5), но не контрольные скремблированные REVERSIR™ (Ctr RVR) обеспечивали понижение уровней повышения ферментов, наблюдаемых относительно их соответствующих мишеней, siRNA-1, siRNA-4 или siRNA-5 (фиг. 44D), и уменьшение тяжести и частоты возникновения выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых

признаков в печени (фиг. 44Е и таблица 16). Соединения REVERSIR™, вводимые отдельно, не обладали токсичными эффектами (фиг. 44D). Путем введения подхода REVERSIR™ siRNA-индуцированная гепатотоксичность снижалась без влияния на загрузку RISC и без изменения химической структуры siRNA. Таким образом, эти данные подтверждают гипотезу, что гепатотоксичность управляется нецелевыми эффектами RNAi опосредованными антисмысловой нитью, а не конкуренцией за комплексы RISC с эндогенными путями RNAi или эффектами, опосредованными химической структурой siRNA.

Таблица 16. Гистологические наблюдаемые признаки с применением GalNAc-siRNA с обработкой соединениями REVERSIR™, нацеливающимися на антисмысловую нить, или без нее

	Крыса					
	siRNA-1		siRNA-4		siRNA-5	
	Ctr RVR	RVR-1	Ctr RVR	RVR-4	Ctr RVR	RVR-5
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	2-3	1-2				
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный	2-3	1	1		1	1
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный	1					
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный						
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	2-3	2-3			2-3	1-2
Гиперплазия кл. Купфера/ клет. инфильтраты	1-2	1-2	1		1-2	1-2
Гиперплазия, желчные протоки					1	
Фиброз					1-2	
Повышенные показатели митоза	1-2		1			
Вакуолизация, клетки Купфера			1	1		

[00522] В таблице 16 показано, что обращение активности RISC с загрузкой антисмысловой нити обеспечивает снижение гепатотоксичности. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1-5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

4. Обмен затравочных областей обеспечивает снижение гепатотоксичности

[00523] Аналогично механизмам miRNA, опосредованные RNAi нецелевые эффекты siRNA, как правило, управляются затравочной областью направляющей нити. Если такие эффекты вызывают гепатотоксичность GalNAc-siRNA, наблюдаемую у грызунов, последовательность затравочной области, а не фланкирующей

области за пределами нуклеотидов 2–8, должна представлять собой ключевой определяющий фактор того, связана ли конкретная последовательность с гепатотоксичностью или нет. Для проверки данной гипотезы затравочную область гепатотоксичной siRNA заменяли на затравочную область негепатотоксичной siRNA без изменения паттерна химических модификаций, и наоборот, где затравочную область негепатотоксичной siRNA заменяли на затравочную область гепатотоксичной siRNA без изменения паттерна химических модификаций (**фиг. 46А**).

[00524] Две siRNA с замененными затравочными областями наряду с исходными гепатотоксичными и негепатотоксичными siRNA вводили крысам при токсичной дозе, составляющей 30 мг/кг, шесть раз через день. Показатели воздействия в печени были сравнимы для всех четырех соединений (**фиг. 46В**). Загрузка RISC была меньшей для токсичной исходной siRNA, а также siRNA, содержащей токсичную затравочную область, по сравнению с нетоксичной исходной siRNA или siRNA, содержащей нетоксичную затравочную область (**фиг. 46С**). Несмотря на более низкие уровни загрузки RISC, однако, эти две siRNA были наиболее гепатотоксичными при рассмотрении относительно конкурирования за загрузку RISC в качестве основного движущего фактора гепатотоксичности. Замещение токсичной затравочной области на нетоксичную затравочную область обеспечивала понижение уровней повышения ферментов в печени (**фиг. 46D**) и выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени (**фиг. 46Е** и **таблица 17**), что указывает на то, что затравочная область необходима для обеспечения гепатотоксичности, при этом вклад со стороны химической структуры siRNA является малым или отсутствует. С другой стороны, замена нетоксичной затравочной области на токсичную затравочную область не полностью повторяет гепатотоксичность токсичной siRNA, но не обуславливает повышение уровня ферментов печени (**фиг. 46D**) и увеличение тяжести выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени по сравнению с нетоксичной исходной siRNA (**фиг. 46Е** и **таблица 17**). Это дает основания предполагать, что поскольку требуется комплементарность к антисмысловой затравочной области для

нецелевой активности, 3'-область siRNA также может вносить вклад в нецелевое связывание и репрессию. Эти данные обеспечивают дополнительную поддержку в отношении того, что опосредованные RNAi основанные на затравочной области нецелевые эффекты, а не опосредованные химической структурой или классовые эффекты за счет конкурирования в пути RNAi, являются основным фактором гепатотоксичности у крыс.

Таблица 17. Гистологические наблюдаемые признаки с применением GalNAc-siRNA с обменом затравочных областей или без него

Затравочная	Крыса			
	Токсичн.	Нетоксичн	Нетоксичн	Токсичн.
	Токсичн.	Нетоксичн	Токсичн.	Нетоксичн
Отличная от затравочной				
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	1-4			
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный	2-3			1-2
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный				1
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный				
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	1-2	1	1	1-2
Гиперплазия кл. Купфера/ клет. инфильтраты	1-3			1
Гиперплазия, желчные протоки	1			
Фиброз				
Повышенные показатели митоза	1-2			1
Вакуолизация, клетки Купфера				

[00525] В таблице 17 показано, что обмен затравочных областей уменьшает гепатотоксичность. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака отмечен в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

5. Нецелевые эффекты siRNA являются обогащенными за счет комплементарности затравочной области

[00526] Для подтверждения того, что GalNAc-siRNA могут обуславливать нарушение регуляции генов в соответствии с опосредованными RNAi нецелевыми эффектами, серию siRNA трансфицировали в гепатоциты крыс для оценки глобальных эффектов в отношении транскриптома с помощью сайленсинга РНК (RNAseq) через 24 ч. при "токсической" дозе 10 нМ, которая превышала концентрации IC₅₀ на 2–3 log. Транскрипты, подвергнутые

понижающей регуляции, обогащали для полной комплементарности антисмысловой затравочной области (нуклеотиды 2–8), и величина изменения в целом не превышала двухкратного (фиг. 47А и таблица 18). Такой характеристики обогащения не наблюдалось в случае транскриптов с повышающей регуляцией или в отношении затравочной области смысловой нити. Сходные характеристики профиля нецелевых эффектов наблюдали *in vivo* в органах печени крыс через 24 ч. после дозы 50 мг/кг GalNAc-siRNA (фиг. 47В). Число генов с нарушением регуляции уменьшалось с применением неактивных siRNA, содержащий 5'-концевые кэп-структуры, что указывает на то, что химическая структура 2'F, 2'OMe или PS и/или другие независимые от RISC факторы не вносят значительного вклада в нарушение регуляции генов, согласно результатам исследований токсичности у грызунов (фиг. 38А–38D). Эти данные дополнительно подтверждают вывод, что miRNA-подобная активность антисмысловой нити, а не независимые от RNAi эффекты на основе химической структуры siRNA, является первичным фактором изменений нецелевой экспрессии генов.

Таблица 18. Гистологические наблюдаемые признаки с применением исходной GalNAc-siRNA и GalNAc-siRNA с GNA-модифицированной затравочной областью

GNA-модификация затравочной области	Крыса	
	siRNA-5	siRNA-5-GNA
Дегенерация, гепатоцеллюлярная	2-3	1-2
Некроз, единичная клетка, гепатоцеллюлярный	2-3	1
Некроз, коагуляционный, гепатоцеллюлярный		
Анизоцитоз, гепатоцеллюлярный		
Вакуолизация, гепатоцеллюлярная	2-3	1-2
Гиперплазия клеток Купфера/ клет. инфильтраты	1-2	
Гиперплазия, желчные протоки		
Фиброз	1-2	
Повышенные показатели митоза	1	1
Вакуолизация, клетки Купфера		

[00527] В таблице 18 показано, что нарушающее стабильность опосредованное затравочной областью нецелевое связывание обеспечивает снижение гепатотоксичности. Диапазон степени тяжести для каждого гистологического наблюдаемого признака

отмечен в баллах по шкале 1–5, при этом 1 означает минимальную степень тяжести и 5 означает тяжелую степень.

6. Влияние нарушающего стабильность опосредованного затравочной областью нецелевого связывания

[00528] Если опосредованное затравочной областью распознавание является необходимым для обусловленной нецелевыми эффектами гепатотоксичности GalNAc-siRNA, уменьшение аффинности связывания затравочной области с нецелевыми mRNA должно обладать понижающим эффектом. Для проверки данной гипотезы нарушающий термостабильность нуклеотид GNA помещали в положение семь антисмысловой нити в последовательность гепатотоксичной siRNA-5 (**фиг. 48А**), аналогично предыдущим подходам с применением других нарушающих термостабильность модификаций.

[00529] Согласно гипотезе, что нецелевая активность, опосредованная затравочной областью, управляющая изменениями экспрессии генов, введение GNA в затравочную область антисмысловой нити уменьшало нецелевые показатели по сравнению с исходной siRNA при трансфицировании в гепатоциты крыс при высокой дозе 10 нМ (**фиг. 48В**) с сохранением при этом целевой активности (**фиг. 49А**). Для дополнительного тестирования, транслируется ли уменьшение нецелевых параметров в улучшение безопасности *in vivo*, эти те же две siRNA тестировали в исследовании токсичности у крыс при введении дозы три раза в неделю при 30 мг/кг. По сравнению с исходной последовательностью, замена на нуклеотид GNA в затравочной области не влияла на уровень нокдауна целевой mRNA (**фиг. 49В**), воздействия в печени (**фиг. 48С**) или загрузку RISC (**фиг. 48D**). Однако модификация затравочной области обеспечивала уменьшение уровней повышения ферментов печени (**фиг. 48Е**) и выявленных с помощью микроскопа наблюдаемых признаков в печени (**фиг. 48F**). Кроме предоставления дополнительного доказательства в пользу нецелевых эффектов и против химической токсичности или нарушения пути RNAi как основного фактора, обуславливающего гепатотоксичность, эти данные обеспечивают первое заявленное доказательство, что нарушение термостабильности опосредованного затравочной областью связывания представляет собой

жизнеспособную стратегию для селективного снижения нецелевого подавления и гепатотоксичности siRNA in vivo.

[00530] Все патенты США, публикации заявок на патент США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и не относящиеся к патентам публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Аспекты вариантов осуществления можно модифицировать, если необходимо использовать идеи различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения можно осуществлять в вариантах осуществления в свете подробного описания выше. В целом, в нижеследующей формуле изобретения, используемые термины не должны истолковываться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в данном описании и формуле изобретения, но должны истолковываться так, чтобы включать все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, применимых в отношении таких пунктов формулы. Соответственно, формула изобретения не ограничивается данным раскрытием.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Модифицированные средства на основе РНК, характеризующиеся пониженным нецелевым эффектом

<130> 051058-088343-РСТ

<140> РСТ/US2017/063078

<141> 2017-11-22

<150> 62/561,514

<151> 2017-09-21

<150> 62/548,589

<151> 2017-08-22

<150> 62/425,907

<151> 2016-11-23

<160> 79

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

<210> 2

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Вирус иммунодефицита человека

<400> 3

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

<210> 4

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> Drosophila sp.

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 5
 гааугугааа гисаусгаса а 21

 <210> 6
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 6
 угугсгауга сишсасаиш суг 23

 <210> 7
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 7
 гааугугааа гисаусгаса а 21

 <210> 8
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 8
 угугсгауга сишсасаиш суг 23

 <210> 9
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 9
 гааугугааа гисаусгаса а 21

 <210> 10
 <211> 23
 <212> РНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 10
 uugucgauga cuuucasaau cug 23

<210> 11
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 11
 gaaugugaaa gucaucgaca a 21

<210> 12
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 12
 uugucgauga cuuucasaau cug 23

<210> 13
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 13
 gaaugugaaa gucaucgaca a 21

<210> 14
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид
 <220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид
 <400> 14
 uugucgatga cuuucasaau cug 23

<210> 15
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 15
аасаgиgиис иигсисиааа а 21

<210> 16
<211> 23
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 16
ииаагаgса агаасасиги иии 23

<210> 17
<211> 21
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 17
аасаgиgиис иигсисиааа а 21

<210> 18
<211> 23
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 18
ииаагаgса агаасасиги иии 23

<210> 19
<211> 21
<212> РНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 19
аасаgиgиис иигсисиааа а 21

<210> 20
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

<400> 20
 uuatagagca agaасасиги uuu 23

<210> 21
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 21
 аасагигиис uugсисиааа а 21

<210> 22
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 22
 uuauagagca agaасасиги uuu 23

<210> 23
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 23
 аасагигиис uugсисиааа а 21

<210> 24
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 24
 uuauagagca agaасасиги uuu 23

<210> 25
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 25

аасаgиgиис ииgсисиааа а	21
<210> 26	
<211> 23	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид	
<400> 26	
ииаааgаgса агаасасиги иии	23
<210> 27	
<211> 21	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид	
<400> 27	
аасаgиgиис ииgсисиааа а	21
<210> 28	
<211> 23	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид	
<400> 28	
ииаааgаgса агаасасиги иии	23
<210> 29	
<211> 21	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид	
<400> 29	
иgгааgсаги аиgиiгаиgg а	21
<210> 30	
<211> 23	
<212> РНК	
<213> Искусственная последовательность	
<220>	
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид	
<400> 30	
иссаисааса иасигсиисс ааа	23
<210> 31	

<211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 31
 uggaagcagu auguugaugg a 21

 <210> 32
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 32
 uccaacaaca uacugcuuac aaa 23

 <210> 33
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 33
 uggaagcagu auguugaugg a 21

 <210> 34
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 34
 uccaacaaca uacugcuuac aaa 23

 <210> 35
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 35
 uggaagcagu auguugaugg a 21

 <210> 36
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 36
 uccatcaaca uacugcuuac aaa 23

 <210> 37
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 37
 uggaagcagu auguugaugg a 21

 <210> 38
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 38
 uccaacaaca uacugcuuac aaa 23

 <210> 39
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 39
 uggaagcagu auguugaugg a 21

 <210> 40
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 40
 uccaacaaca uacugcuuac aaa 23

 <210> 41
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 41
 uggaagcagu auguugaugg a 21

<210> 42
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 42
 иссаусааса иасигсиусс ааа 23

<210> 43
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 43
 сиггуаиуиис сиaggguаса а 21

<210> 44
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 44
 иигуасссиа ggaааиасса гаg 23

<210> 45
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 45
 ааиааааgугс ииугаааасg и 21

<210> 46
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 46
 асгиуиуиисаа агсасиуиуаи уга 23

<210> 47
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 47
 суусуааауг ааугаасааа а 21

<210> 48
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 48
 уууугуусаа усауаагаа гас 23

<210> 49
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 49
 суусуааауг ааугаасааа а 21

<210> 50
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 50
 уууугтусаа усауаагаа гас 23

<210> 51
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 51
 суусуааауг ааугаасааа а 21

<210> 52
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 52
 uuuugutcaa ucauuuааgаа gас 23

 <210> 53
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 53
 cuucuuааug auugaасааа а 21

 <210> 54
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 54
 uuuuguucaa ucauuuааgаа gас 23

 <210> 55
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 55
 cuucuuааug auugaасааа а 21

 <210> 56
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 56

uuuugutcaa ucauuaagaa gac

23

<210> 57

 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 57

uacagucuau gu

12

<210> 58

<211> 12

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 58

acauagacug ua

12

<210> 59

$\langle 211 \rangle$ 21

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 59

ugacaaaaua acucacuaaua a

21

$\langle 210 \rangle$ 60

<211> 23

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 $\langle 400 \rangle \quad 60$

uuauagugag uuauuuuguc aaU

23

<210> 61

$\langle 211 \rangle$ 21

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

$\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 61

gugcacuucg cuucaccucu a

21

<210> 62

<211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 62
 uagaggugaa gсgaagugса суи 23

 <210> 63
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 63
 gguuaасасg uuuuаgаuса а 21

 <210> 64
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 64
 uuаgаuсаuuаа асguuuаас саg 23

 <210> 65
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 65
 аасаguguuс uuгсuсуаuа а 21

 <210> 66
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 <400> 66
 uuаuаgаgса аgаасасugи uuи 23

 <210> 67
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 67
 gaaugugaaa giscaugasa a 21

<210> 68
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 68
 uugucgauga cuuucasaau cug 23

<210> 69
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 69
 cugguauiiuc cuaggguaa a 21

<210> 70
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 70
 uuguaassua ggaauaassa gag 23

<210> 71
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 71
 cuucuaaug auugaasaaa a 21

<210> 72
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 72

uuuuguucaa ucauuuagaa gac

23

<210> 73

<211> 21

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 73

aagcaagaua uuuuuauaau a

21

<210> 74

<211> 23

$\langle 212 \rangle$ PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 74

uauuauaaaa auaucuugcu uuu

23

<210> 75

<211> 21

$\langle 212 \rangle$ PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 75

aagcaagaua uuuuuauaau a

21

<210> 76

<211> 23

<212> PHK

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 76

uauuauaaaa auaucuugcu uuu

23

<210> 77

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

 $\langle 220 \rangle$

<223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

<400> 77

cucactataa

10

<210> 78
<211> 10
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

<400> 78
ugcuctataa 10

<210> 79
<211> 10
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<220>
<223> Описание объединенной молекулы ДНК/РНК: Синтетический олигонуклеотид

<400> 79
tcaucgacaa 10

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула двухнитевой РНК (dsRNA), способная к подавлению экспрессии целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, где указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области или ее предшественника, где указанная смысловая нить содержит лиганд ASGPR.

2. Молекула dsRNA по п. 1, где dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор.

3. Молекула dsRNA по п. 2, где в нуклеотидных положениях 3-9 антисмысловой нити отсутствуют 2'-фтор-модификации.

4. Молекула dsRNA по п. 1, имеющая следующие характеристики:

а) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положениях 4-8 5'-области антисмысловой нити;

б) и каждая из смысловой и антисмысловой нитей содержит по меньшей мере две 2'-фтор-модификации; и

с) лиганд ASGPR присоединен к любому концу смысловой нити.

5. Молекула dsRNA по п. 4, где в нуклеотидных положениях 3-9 антисмысловой нити отсутствуют 2'-фтор-модификации.

6. Молекула dsRNA по п. 1, где антисмысловая нить имеет по меньшей мере две из следующих характеристик:

а) нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в положениях 4-8 антисмысловой нити;

б) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации;

с) фосфотиоатная межнуклеотидная связь между нуклеотидными положениями 1 и 2 (считая от 5'-конца);

д) она имеет длину, составляющую 18-35 нуклеотидов.

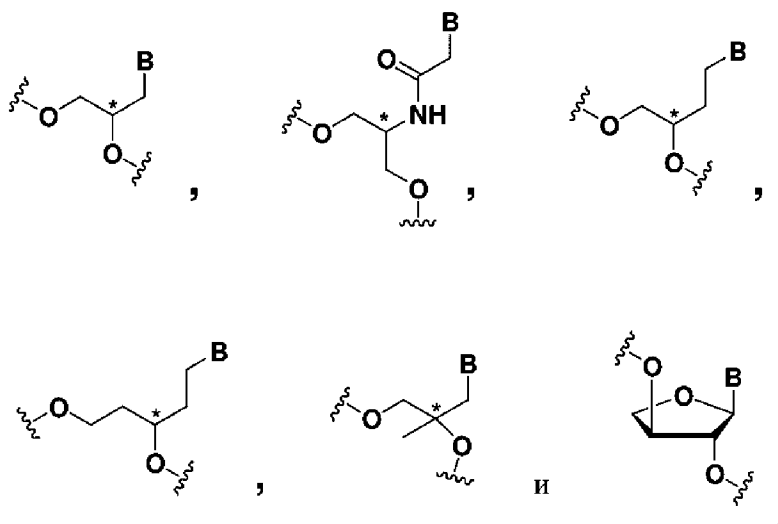
7. Молекула dsRNA по п. 6, где в нуклеотидных положениях 3-9 антисмысловой нити отсутствуют 2'-фтор-модификации.

8. Молекула dsRNA по п. 1, где смысловая нить имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:

- а) лиганд ASGPR присоединен к любому концу смысловой нити;
- б) по меньшей мере две 2'-фтор-модификации;
- с) смысловая нить и антисмысловая нить проявляют достаточную комплементарность для образования двухнитевого участка, охватывающего по меньшей мере 19 нуклеотидных положений, и при этом нарушающая термостабильность модификация дуплекса находится в пределах указанного двухнитевого участка.

9. Молекула dsRNA по п. 8, где в нуклеотидных положениях 3-9 антисмысловой нити отсутствуют 2'-фтор-модификации.

10. Молекула dsRNA по п. 1, где нарушающая термостабильность модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

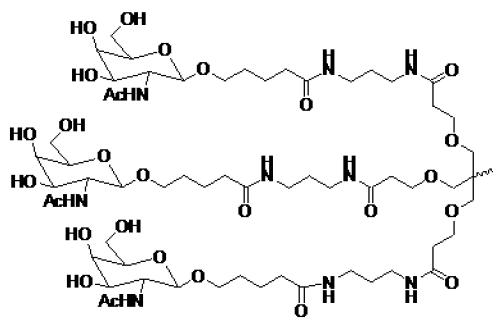


где В представляет собой нуклеиновое основание.

11. Молекула dsRNA по п. 1, где стабилизирующая модификация находится в положении 7 антисмысловой нити.

12. Молекула dsRNA по п. 1, где лиганд ASGPR предусматривает одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

13. Молекула dsRNA по п. 8, где лиганд ASGPR представляет собой:



14. Молекула двухнитевой РНК (dsRNA), способная к подавлению экспрессии целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов, где антисмысловая нить характеризуется достаточной комплементарностью с целевой последовательностью для опосредования РНК-интерференции, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области, и dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C.

15. Молекула dsRNA по п. 14, где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 55°C до приблизительно 67°C.

16. Молекула dsRNA по п. 1, где по меньшей мере 50% антисмысловой нити присутствует в печени на 7 день после введения.

17. dsRNA по п. 16, где dsRNA дополнительно имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок с длиной 12-40 пар нуклеотидов; (viii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити; и (ix) смысловая нить содержит одну или несколько LNA-модификаций.

18. dsRNA по п. 17, где в положениях 3-9 антисмысловой нити

отсутствуют 2'-фтор-модификации.

19. Средство на основе dsRNA по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит 21 нуклеотид, и антисмысловая нить содержит 23 нуклеотида.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе dsRNA по любому из предыдущих пунктов отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем.

21. Набор для сайленсинга генов, содержащий молекулу dsRNA по любому из предыдущих пунктов.

22. Способ обеспечения сайленсинга целевого гена в клетке, при этом способ включает стадию введения молекулы dsRNA по любому из пп. 1-14 в клетку.

23. Способ по п. 22, где средство на основе dsRNA вводят посредством подкожного или внутривенного введения.

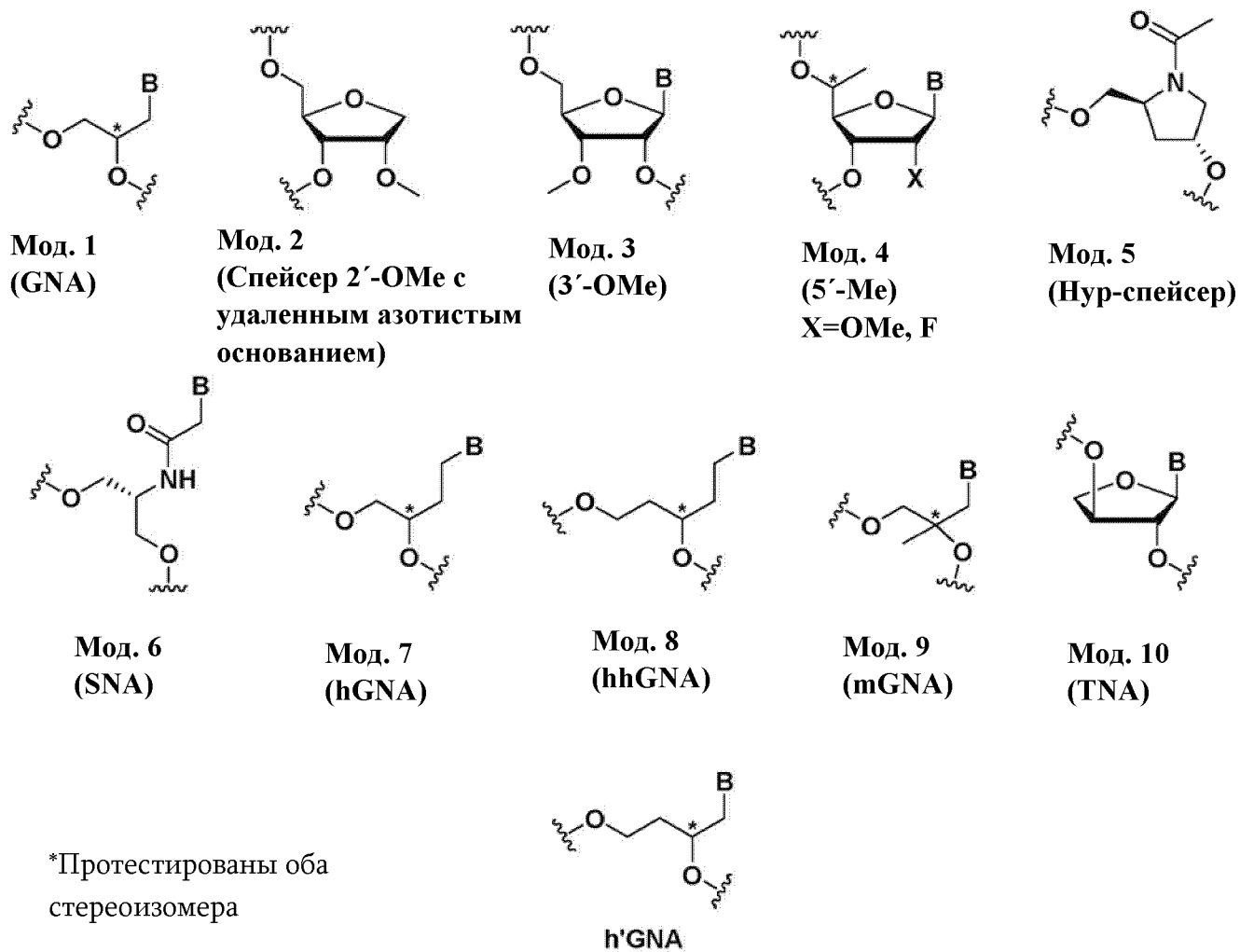
24. Способ обеспечения сайленсинга целевого гена в клетке, при этом способ включает стадию обеспечения экспрессии молекулы dsRNA по любому из пп. 1-14 в клетке.

25. Способ ослабления нецелевых эффектов, обусловленных антисмысловой нитью молекул dsRNA, при этом способ включает стадию введения молекулы dsRNA по любому из пп. 1-19 в клетку.

26. Способ доставки полинуклеотида к конкретной мишени у субъекта путем введения средства на основе dsRNA по любому из пп. 1-19.

27. Способ по п. 26, где указанную стадию введения осуществляют посредством путей введения, предусматривающих внутримышечное, внутрибронхиальное, внутриплевральное, внутрибрюшинное, внутриартериальное, внутрилимфатическое, внутривенное, подкожное, цереброспинальное введение или их комбинации.

По доверенности

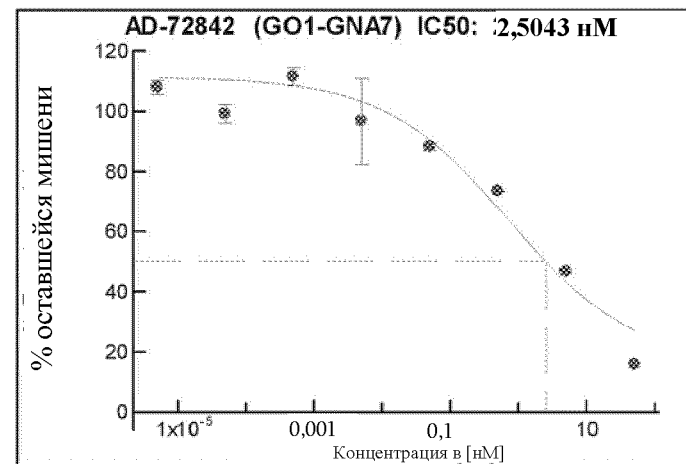
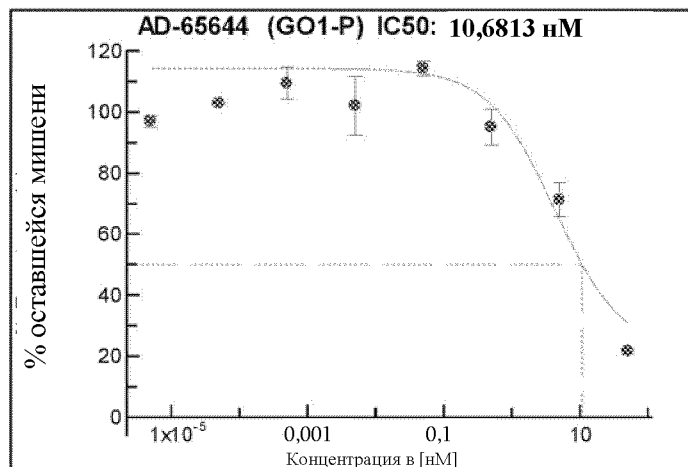


ФИГ. 1

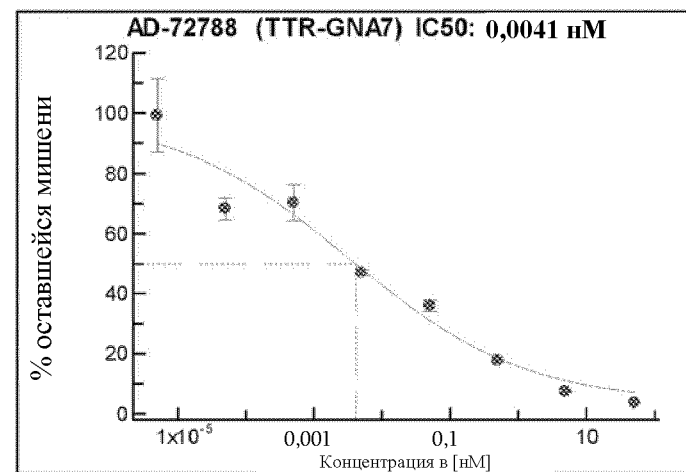
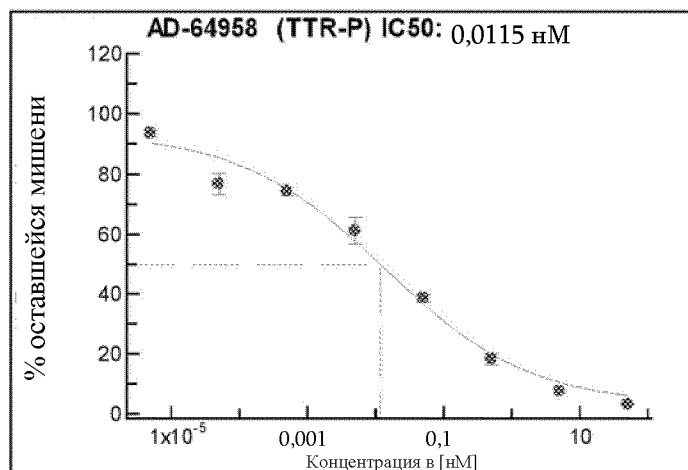
GO1

Исходная

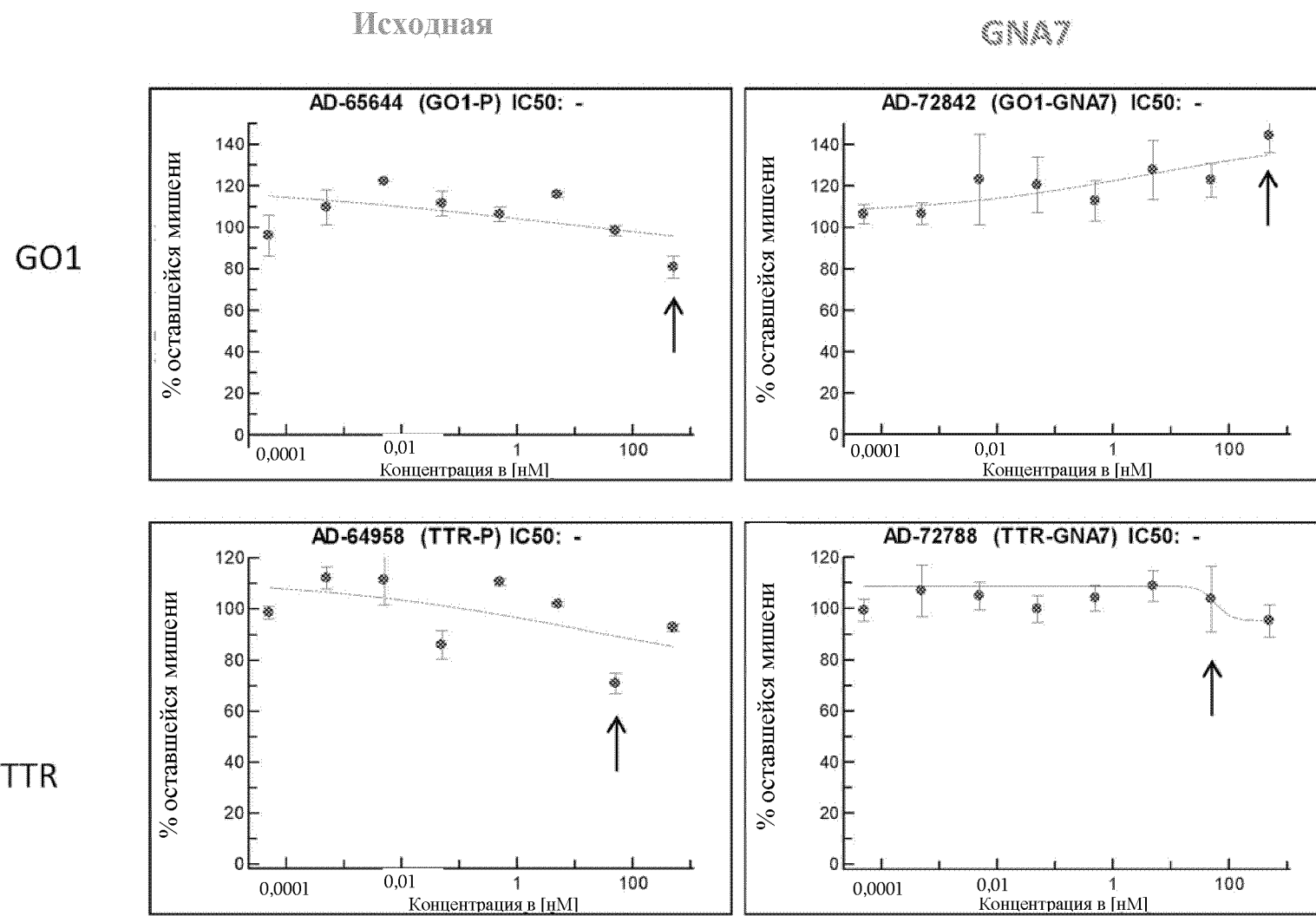
GNA7



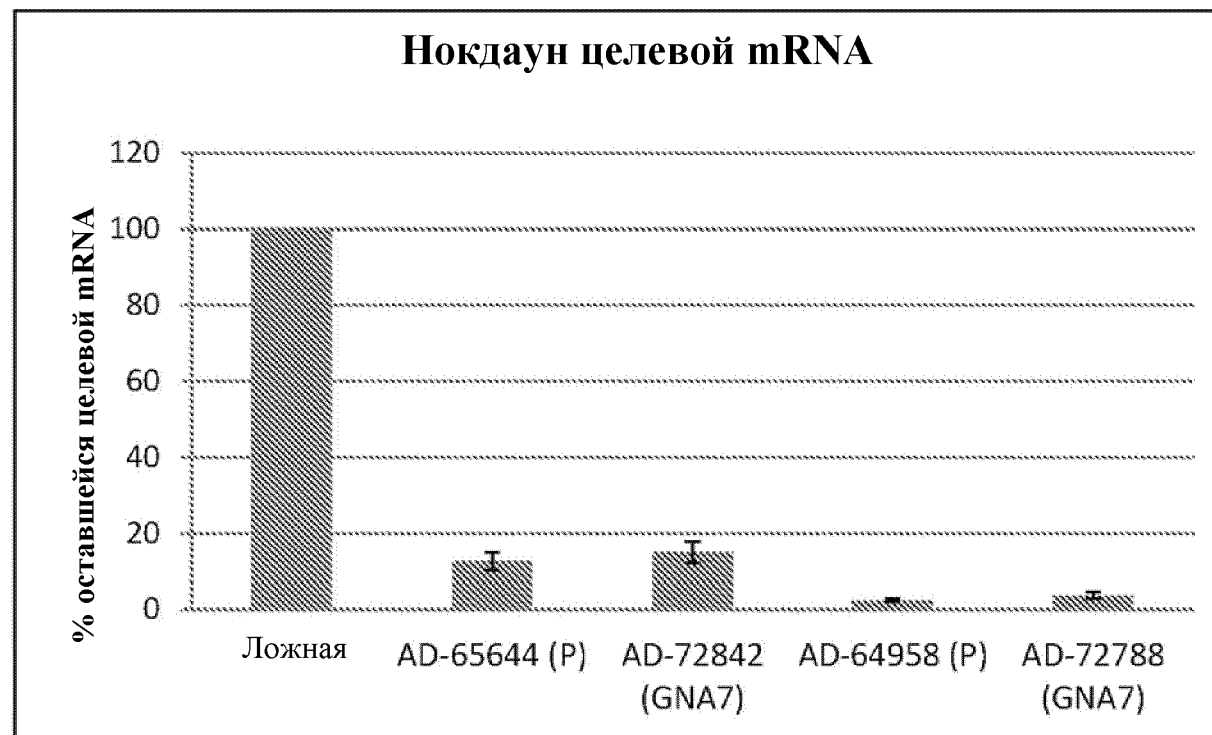
TTR



ФИГ. 3

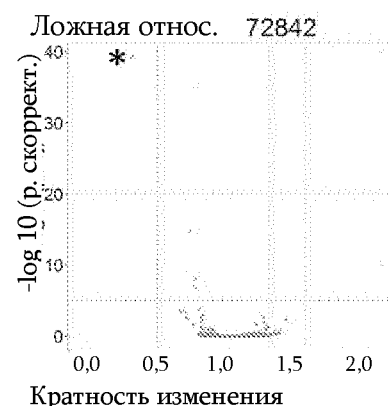
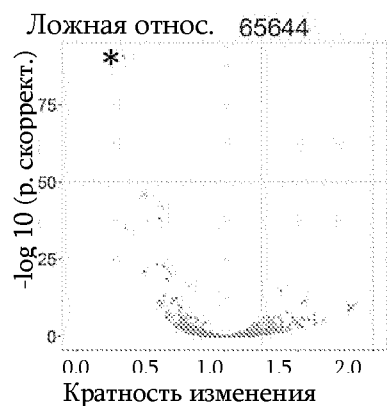


ФИГ. 4



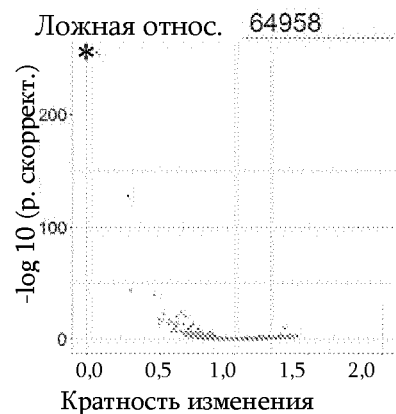
ФИГ. 5

GO1



	DEG (Пониж.)	DEG (Повыш.)
AD-65644 (P)	190	160
AD-72842 (GNA7)	15	6
	-93%	-96%

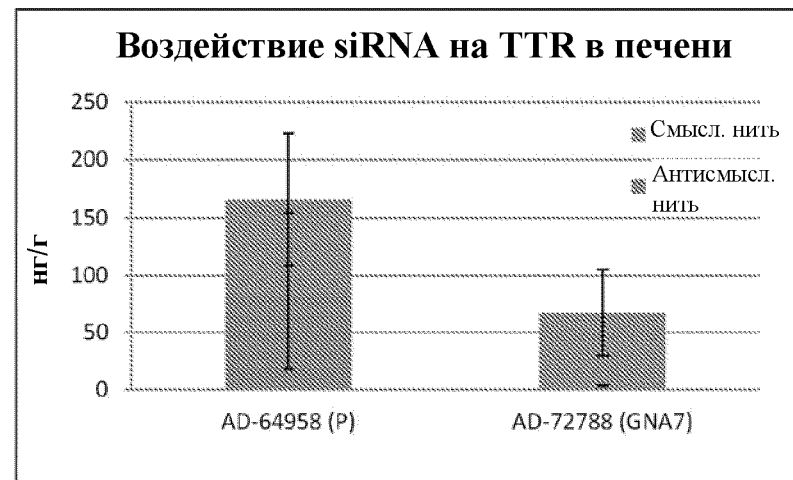
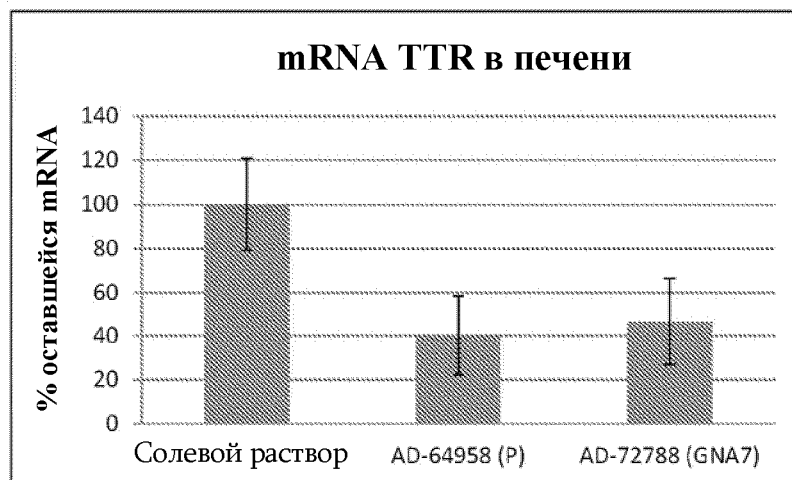
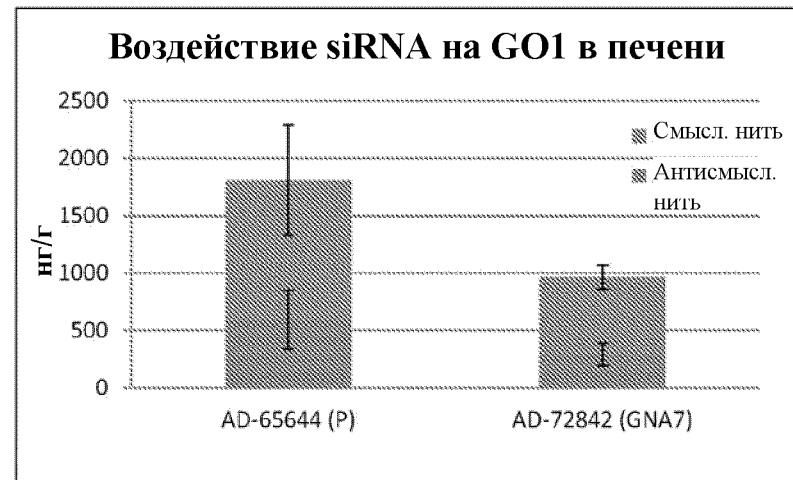
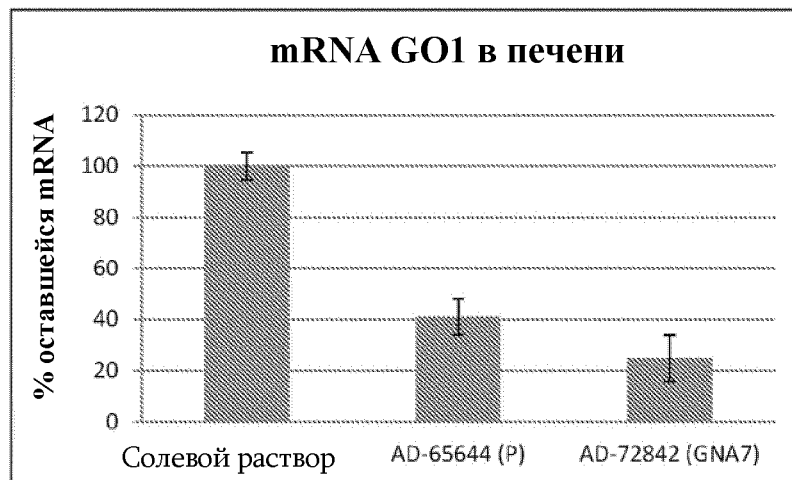
TTR



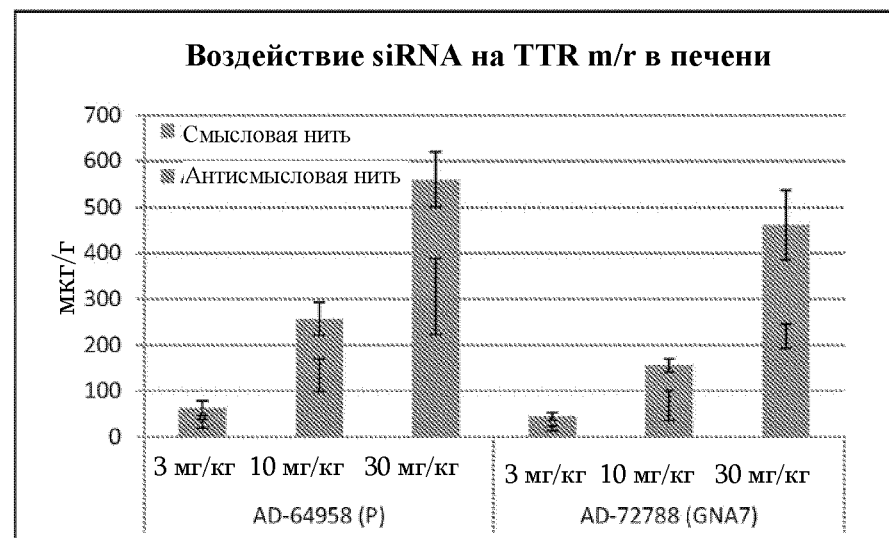
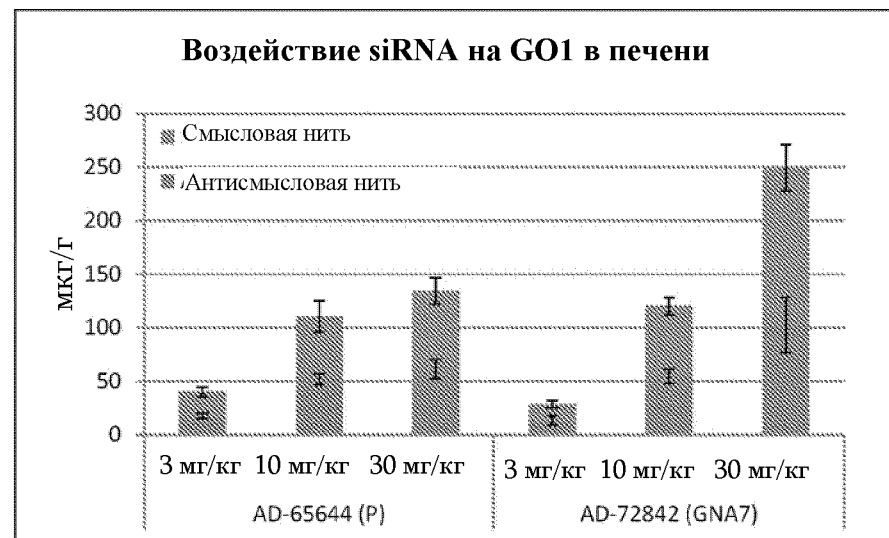
	DEG (Пониж.)	DEG (Повыш.)
AD-64958 (P)	151	36
AD-72788 (GNA7)	1 (TTR)	5
	-100%	-86%

*Целевая

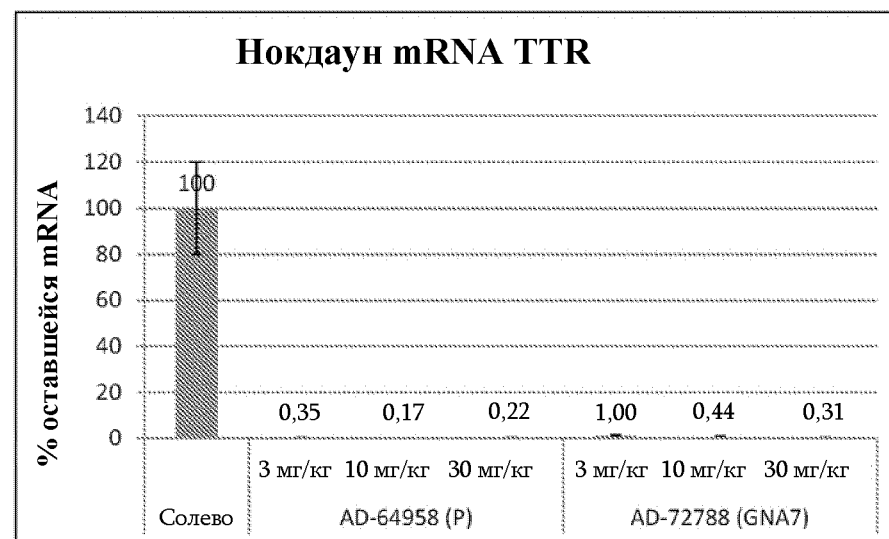
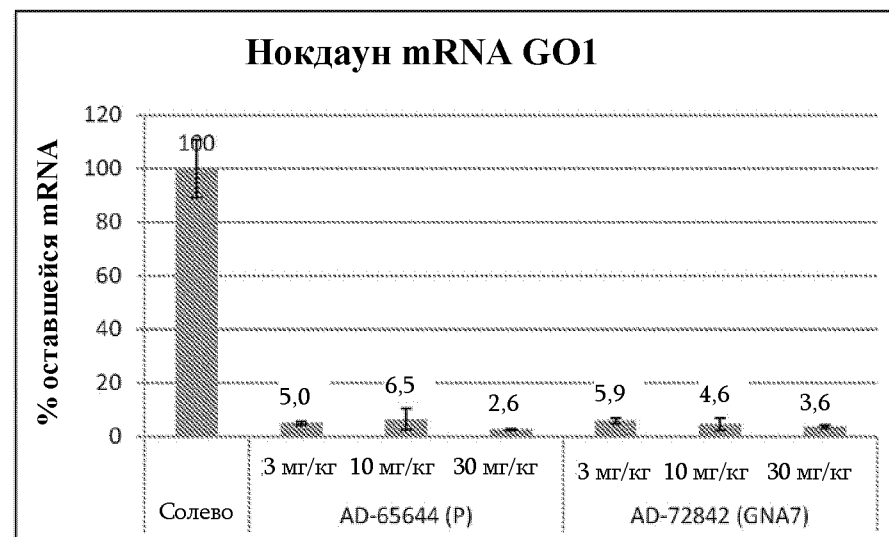
ФИГ. 6



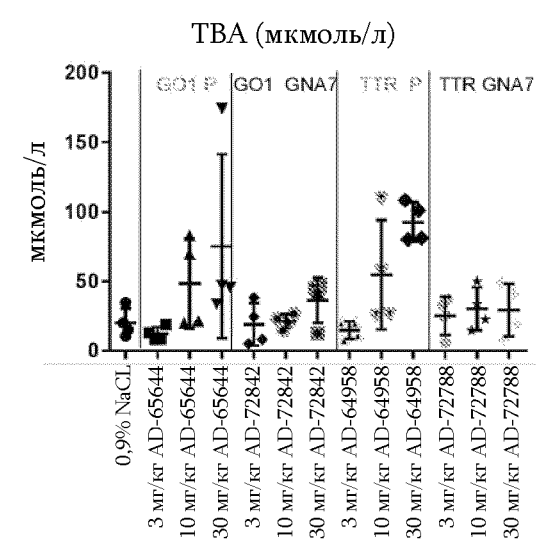
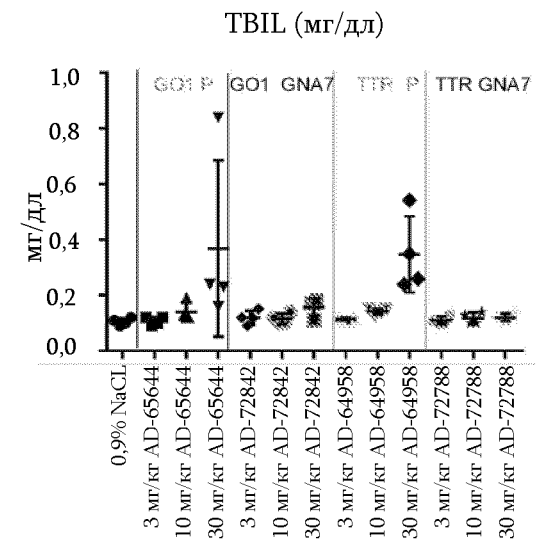
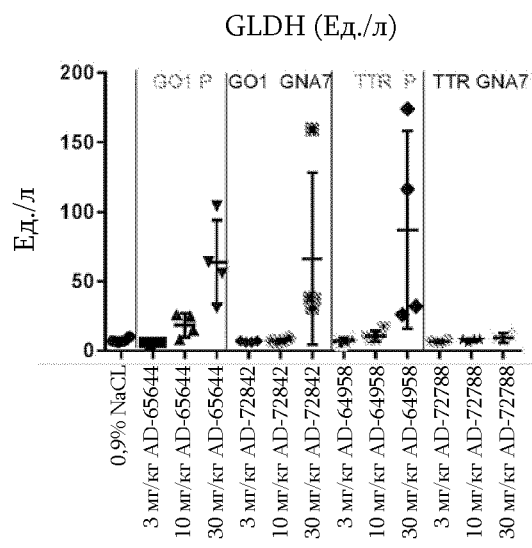
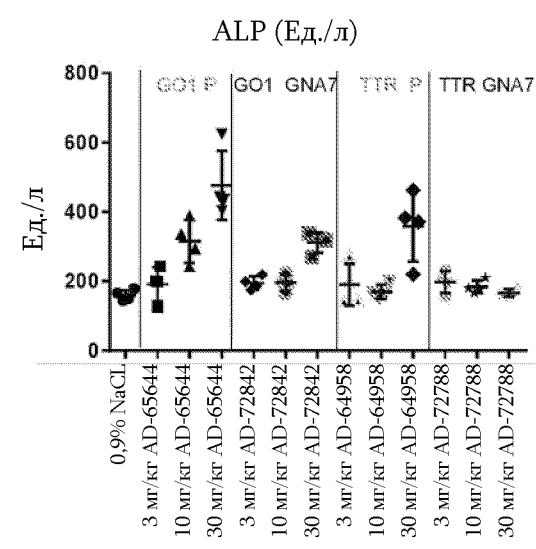
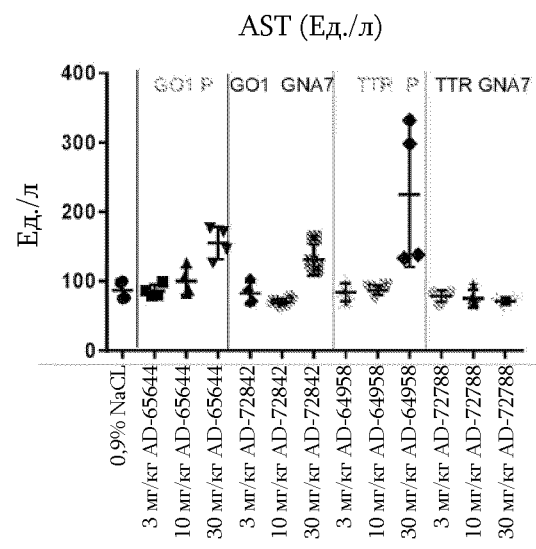
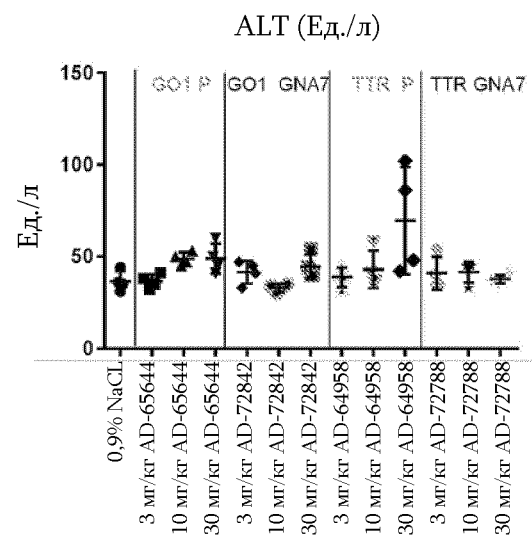
ФИГ. 7



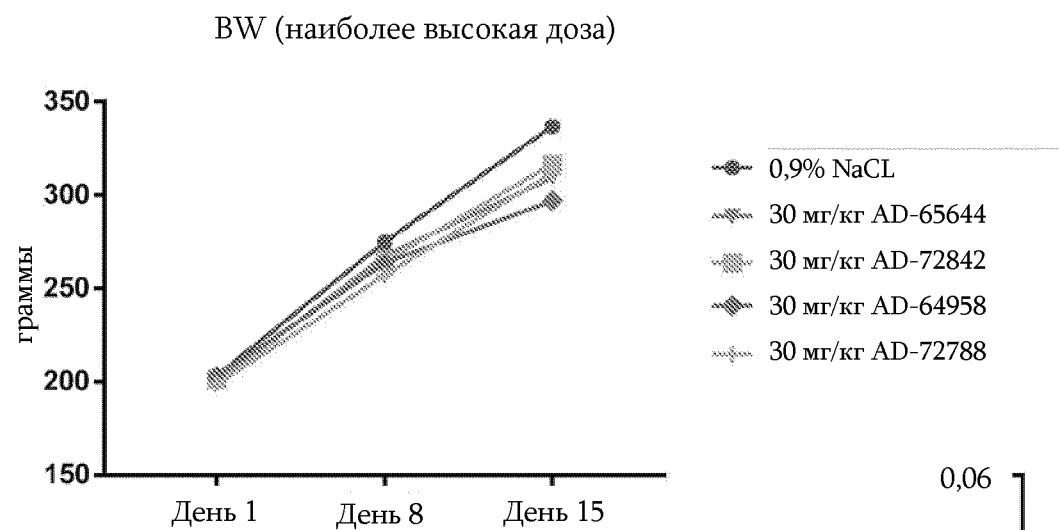
ФИГ. 8



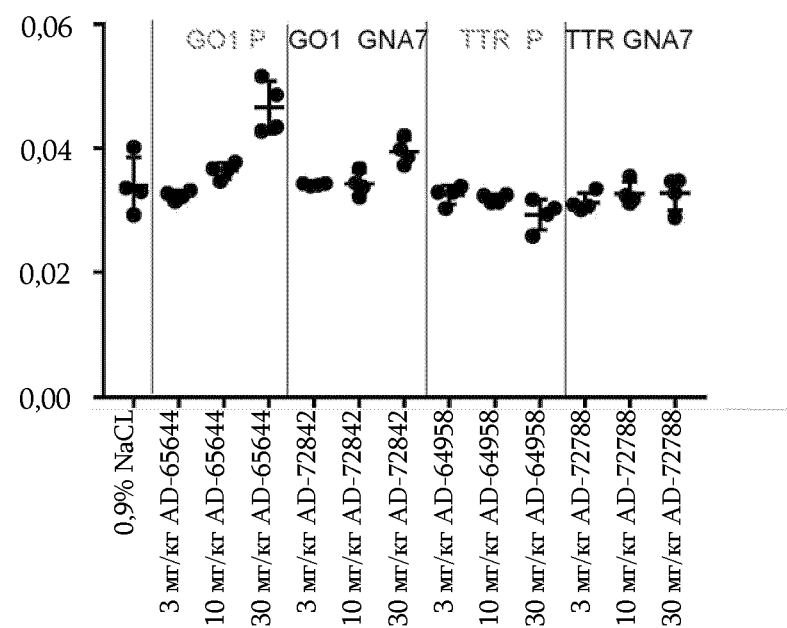
ФИГ. 9



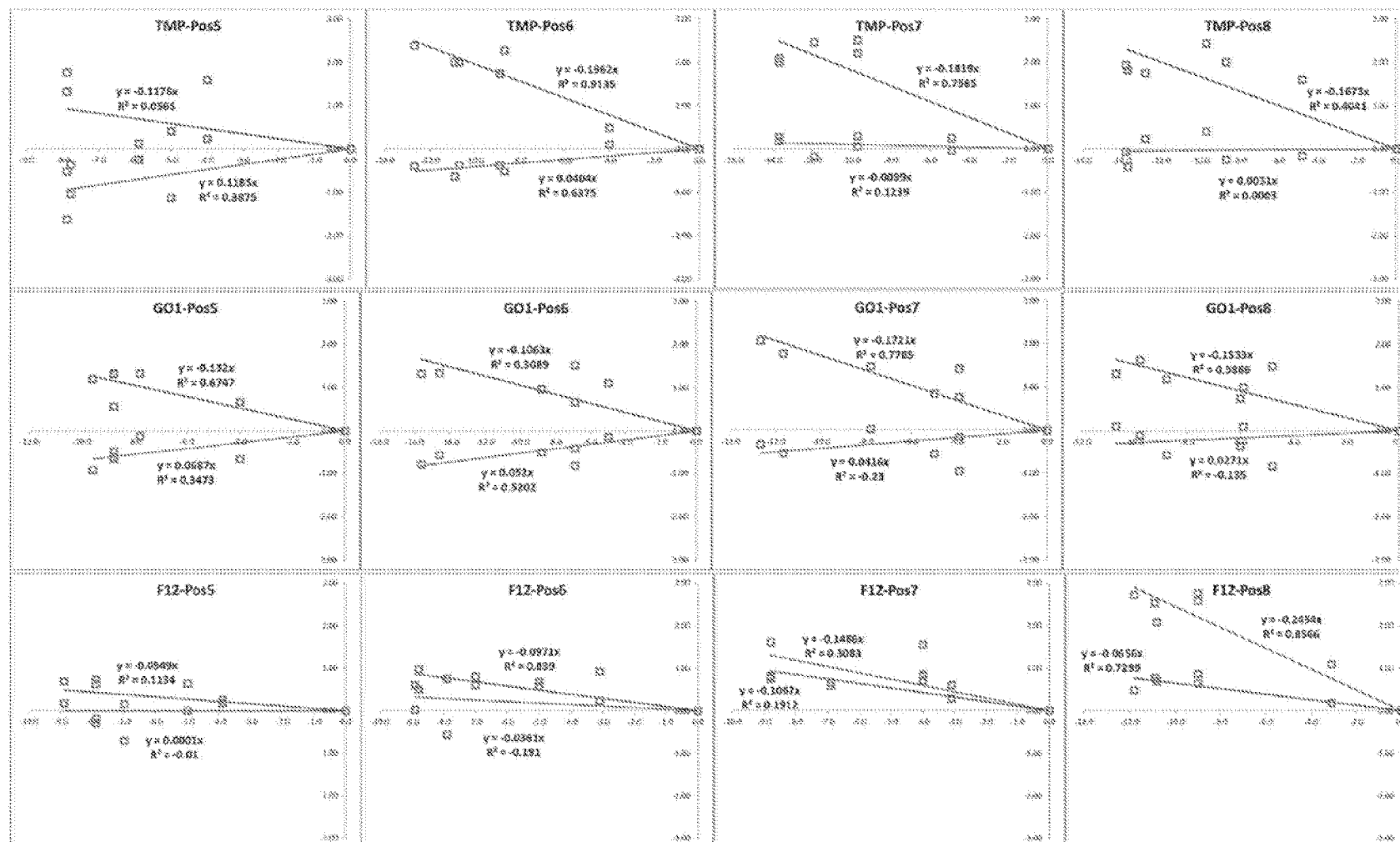
ФИГ. 10



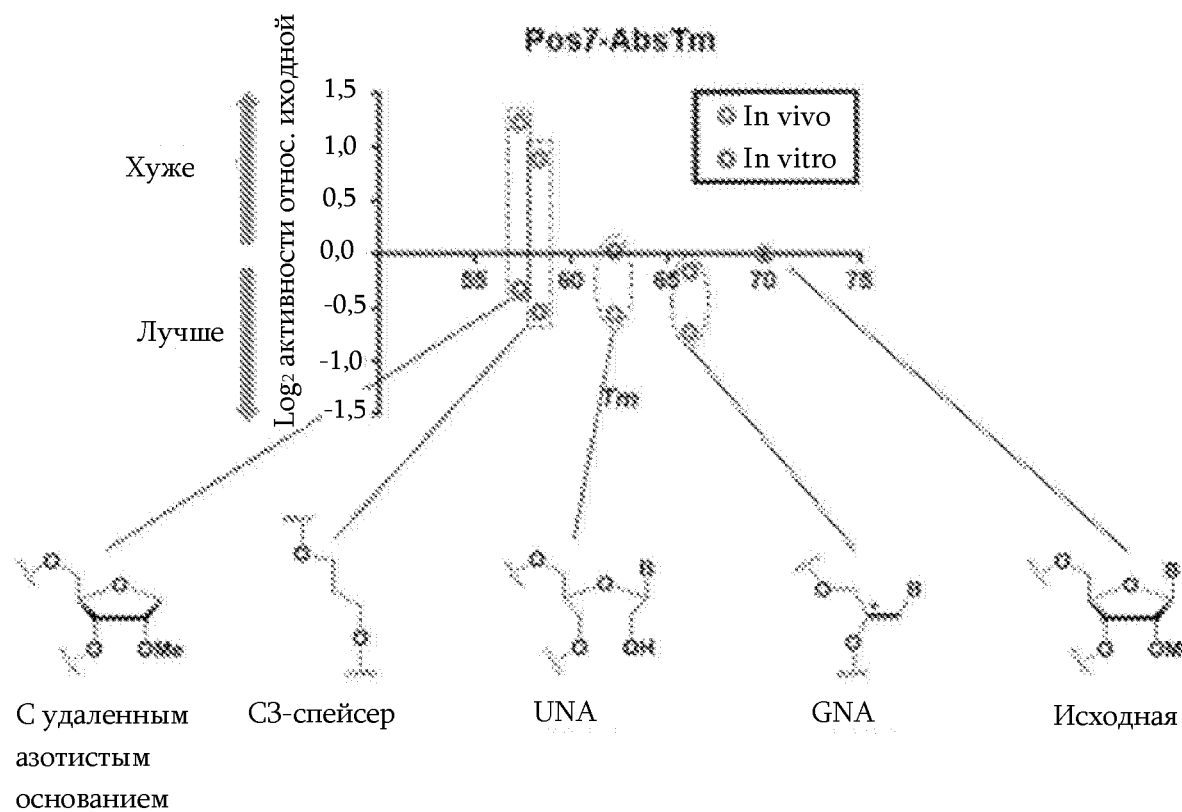
Соотношение печень/BW (D16)



ФИГ. 11



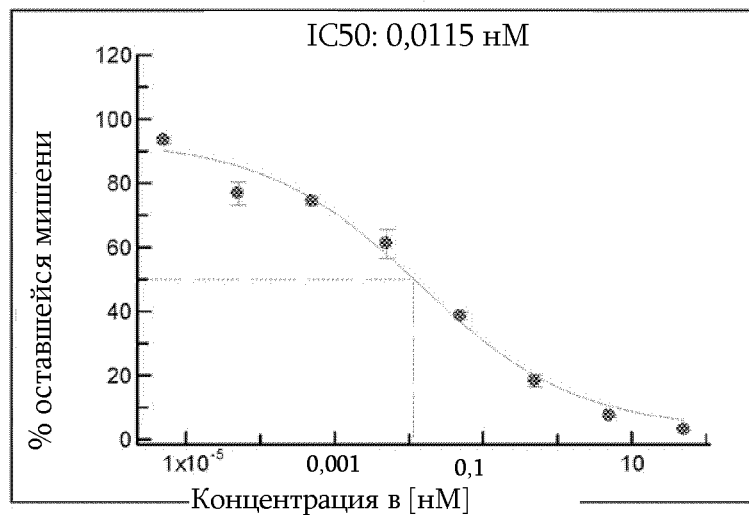
Фиг. 12



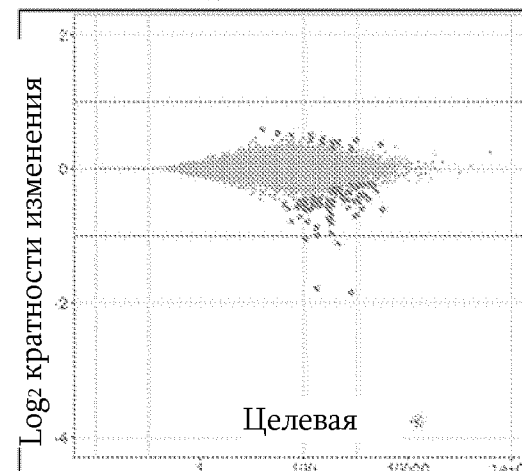
ФИГ. 13

AD-64958

Эффективность

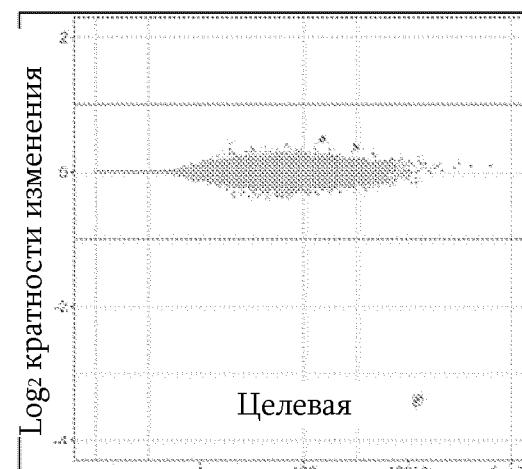
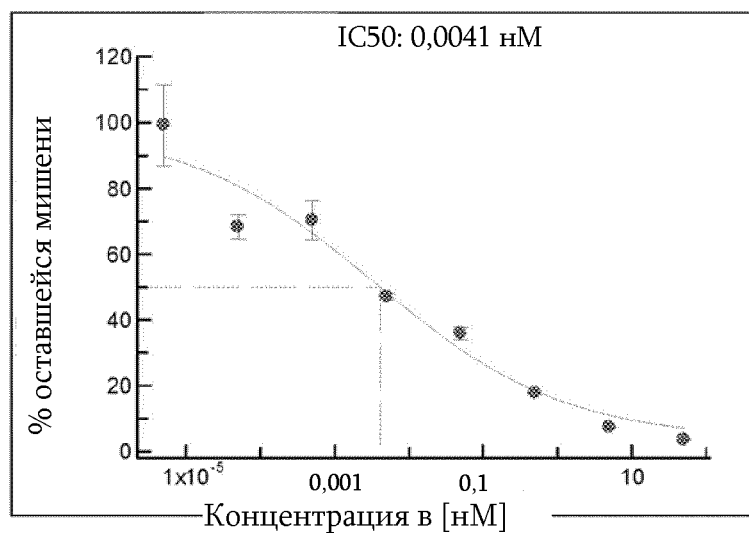


Нецелевая активность

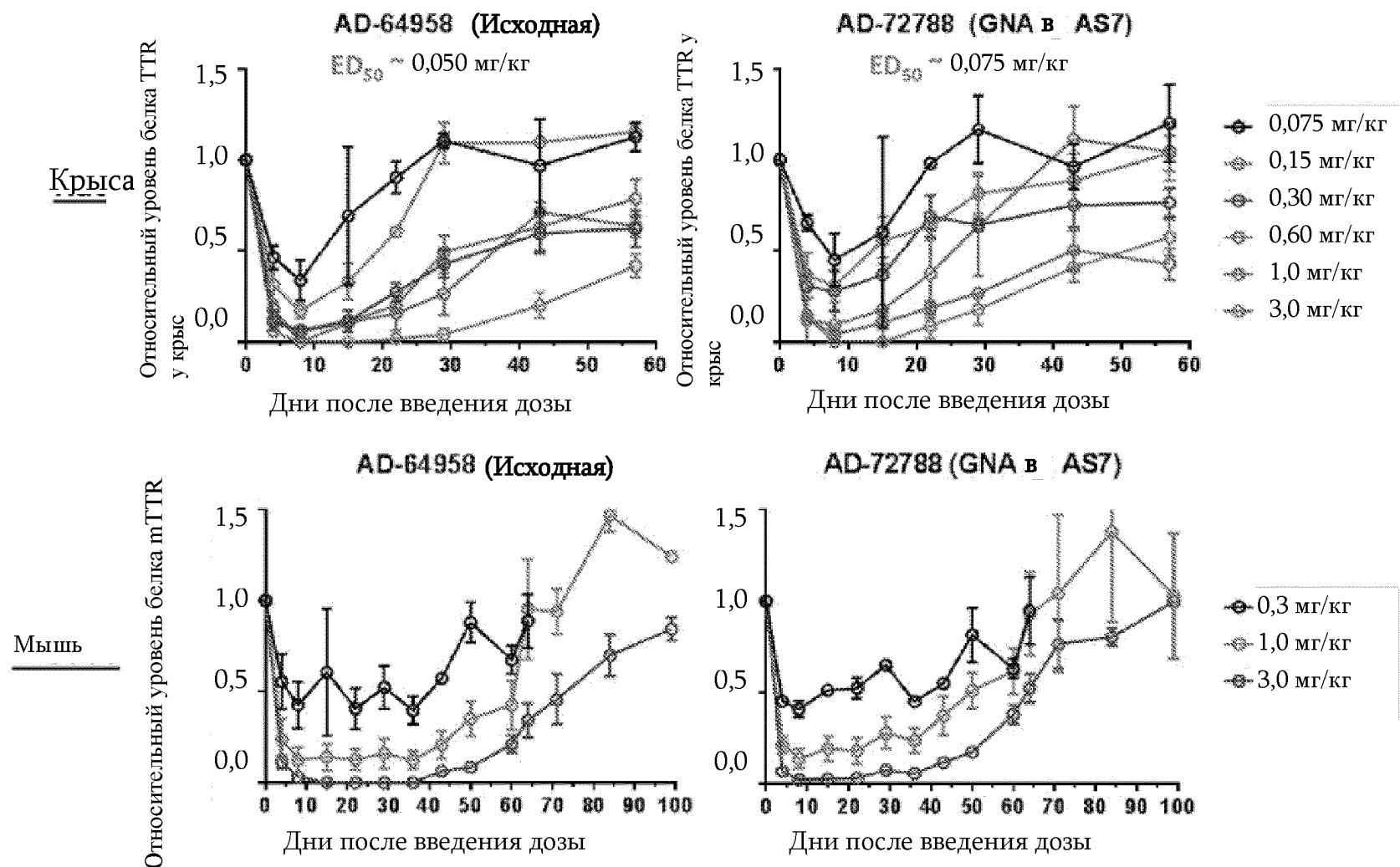


AD-72788
(GNA в AS7)

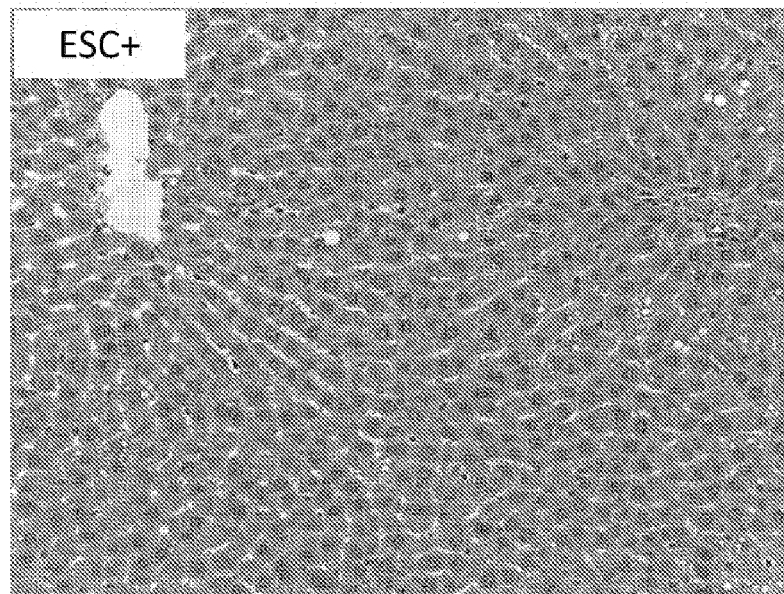
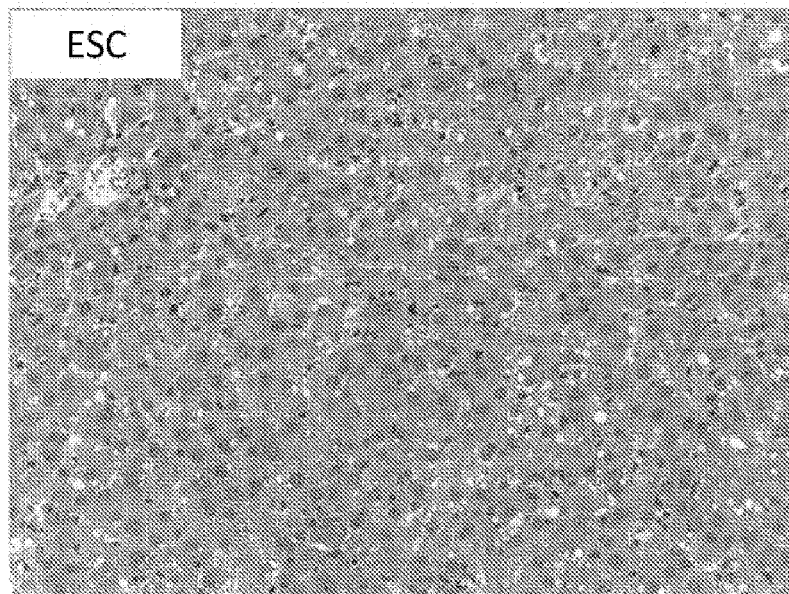
IC50: 0,0041 нМ



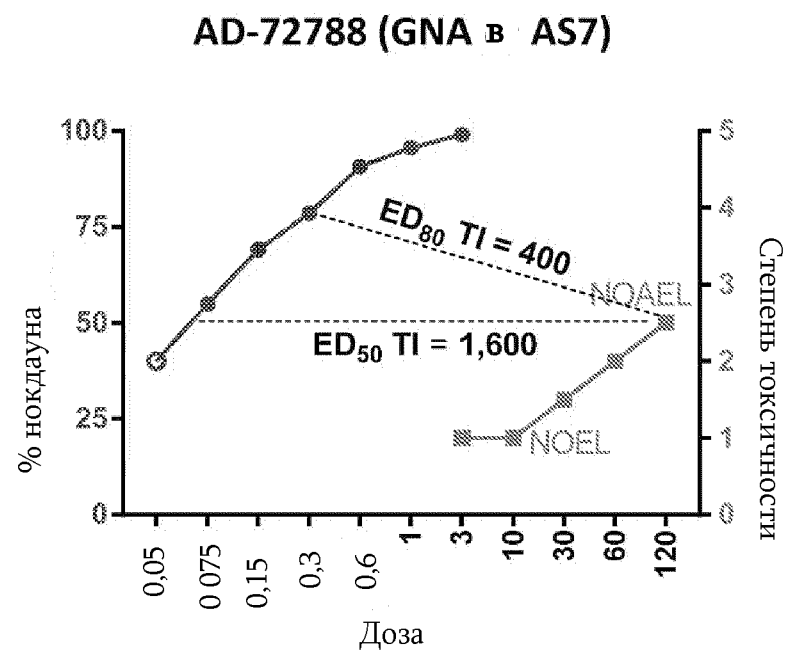
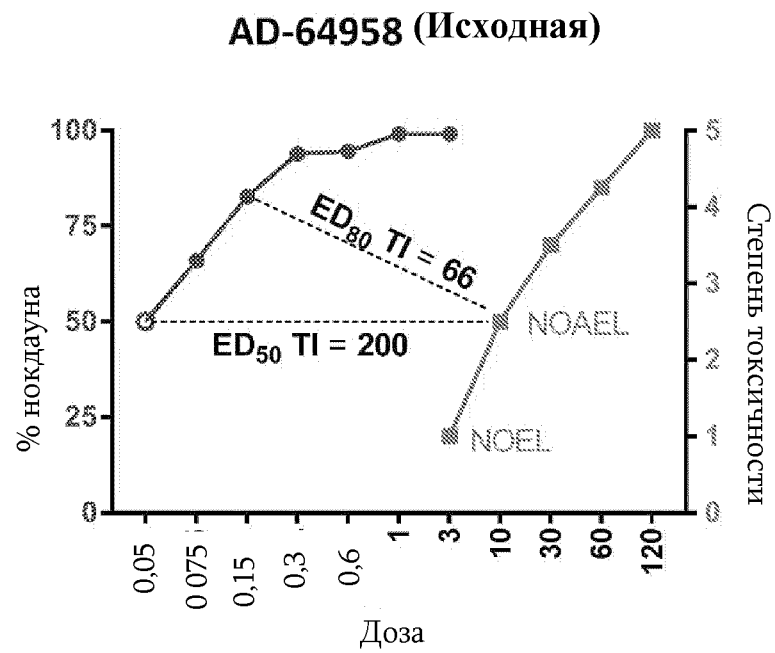
ФИГ. 14



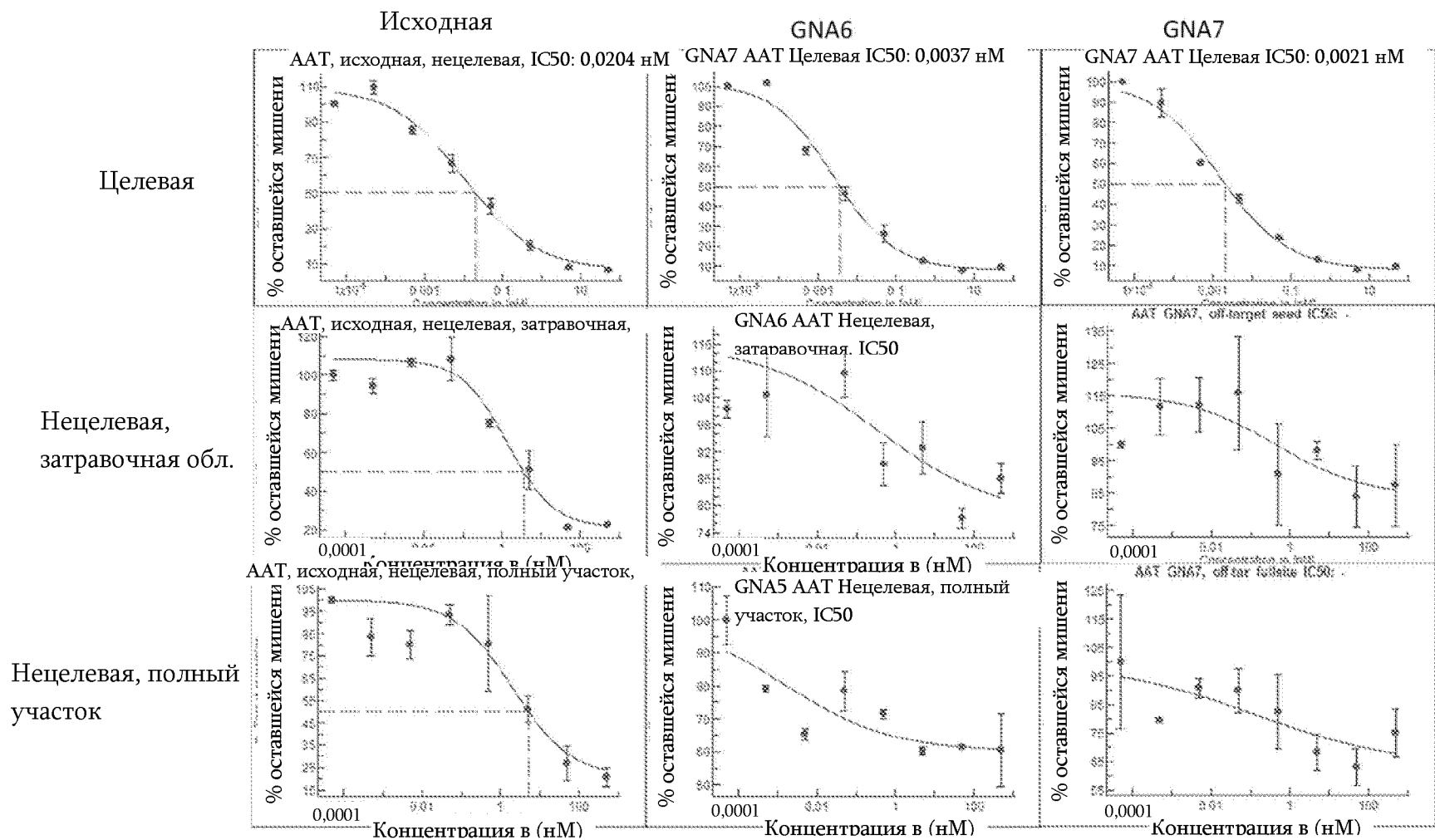
ФИГ. 15



ФИГ. 16

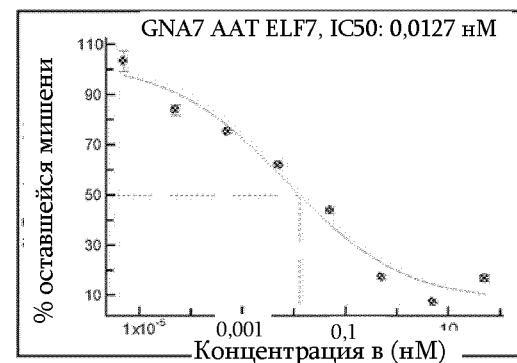
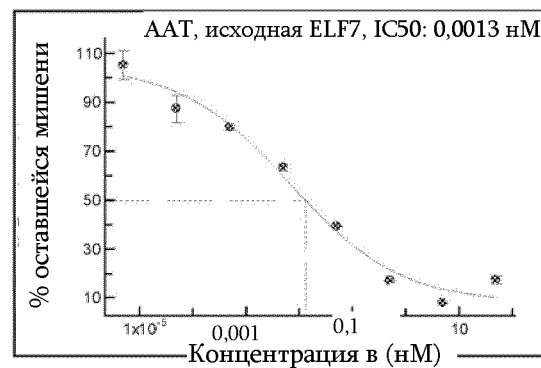


ФИГ. 17

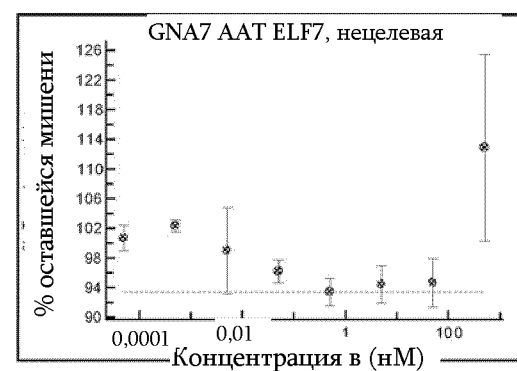
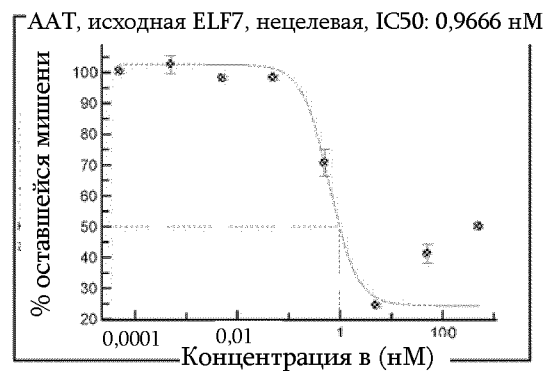


ФИГ. 18

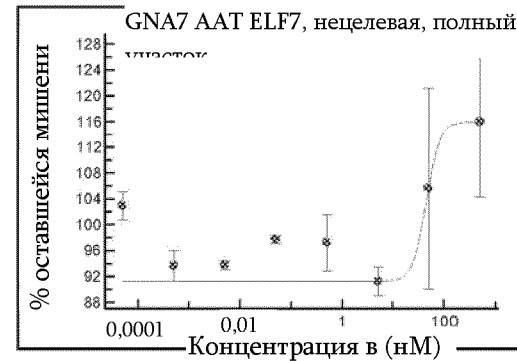
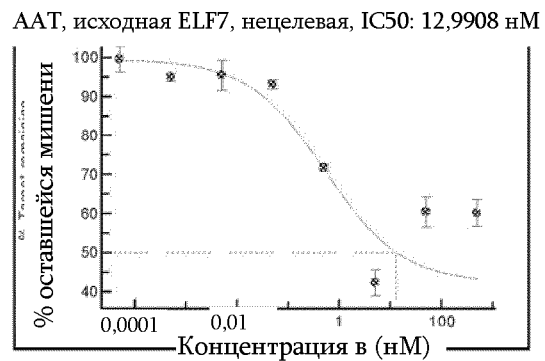
Целевая



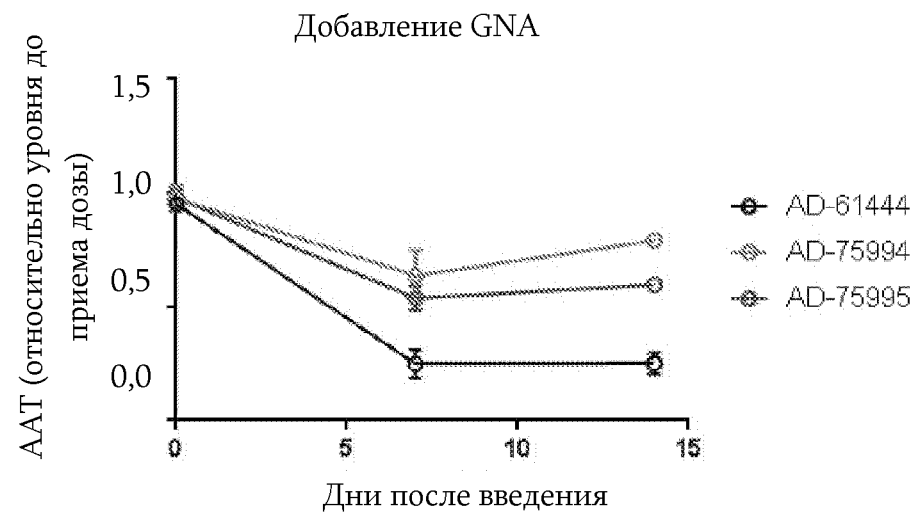
Нецелевая,
затравочная обл.



Нецелевая, полный
участок



ФИГ. 19

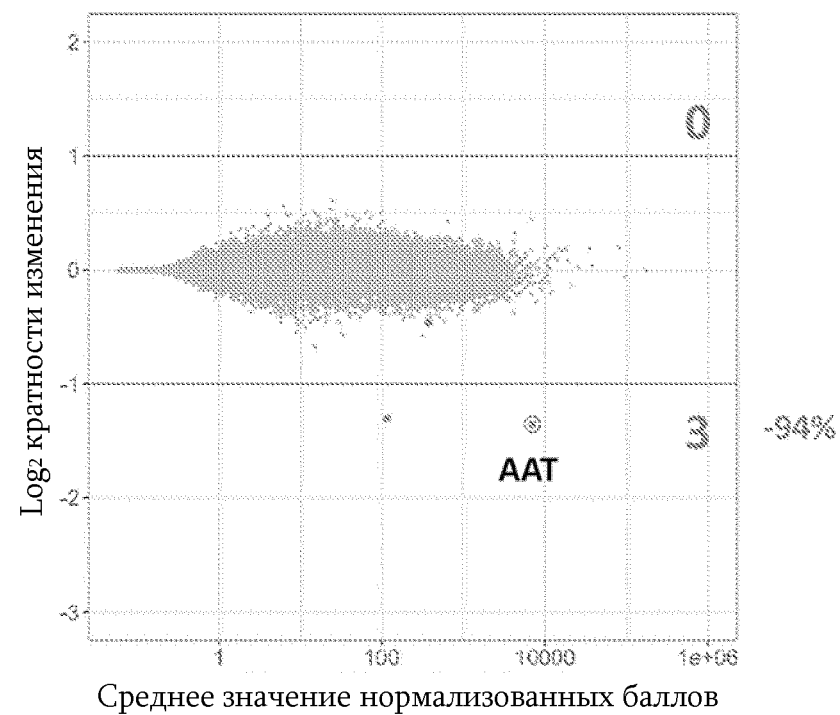


ФИГ. 20

AD-61444

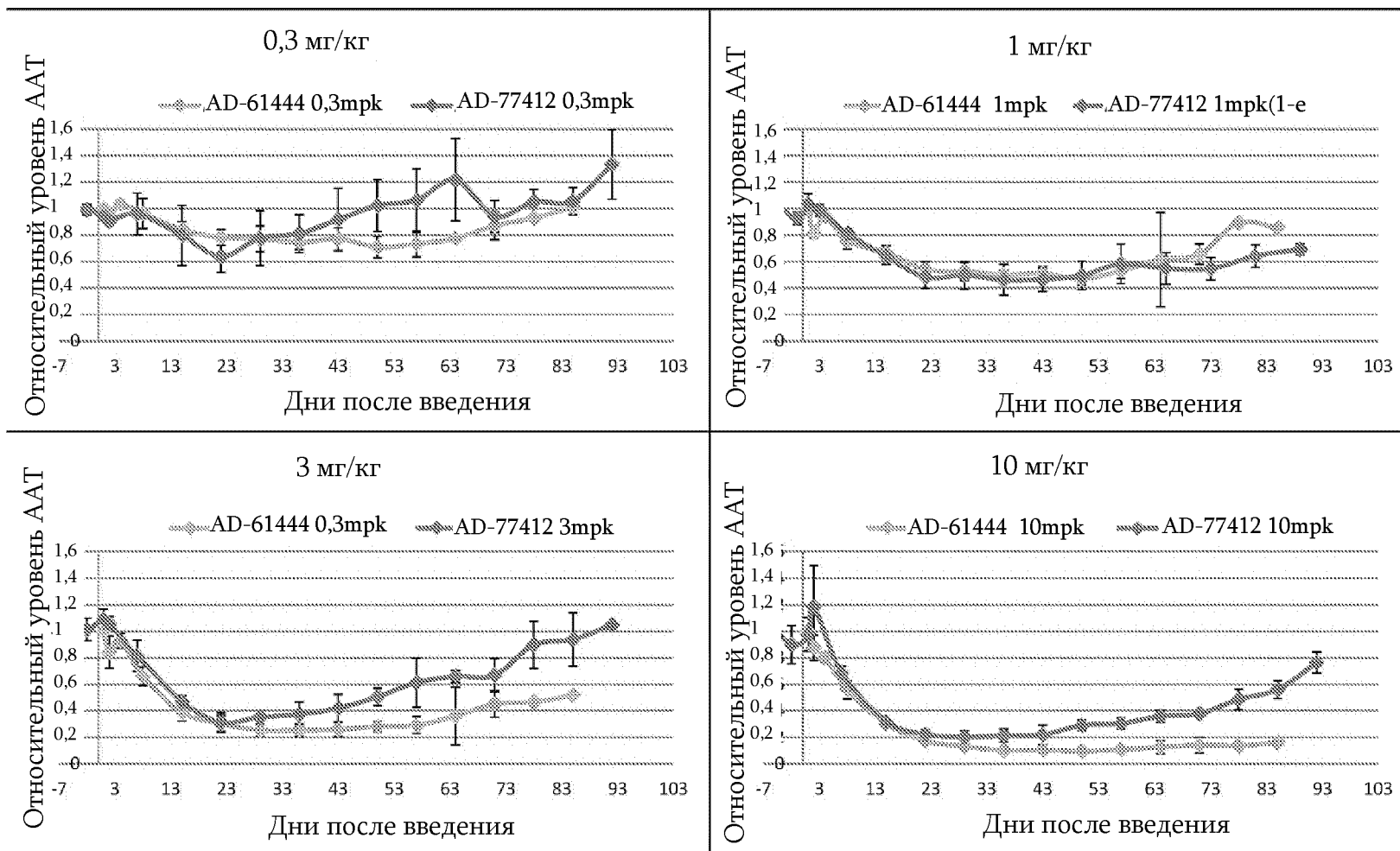


AD-74712 (GNA_B AS7)

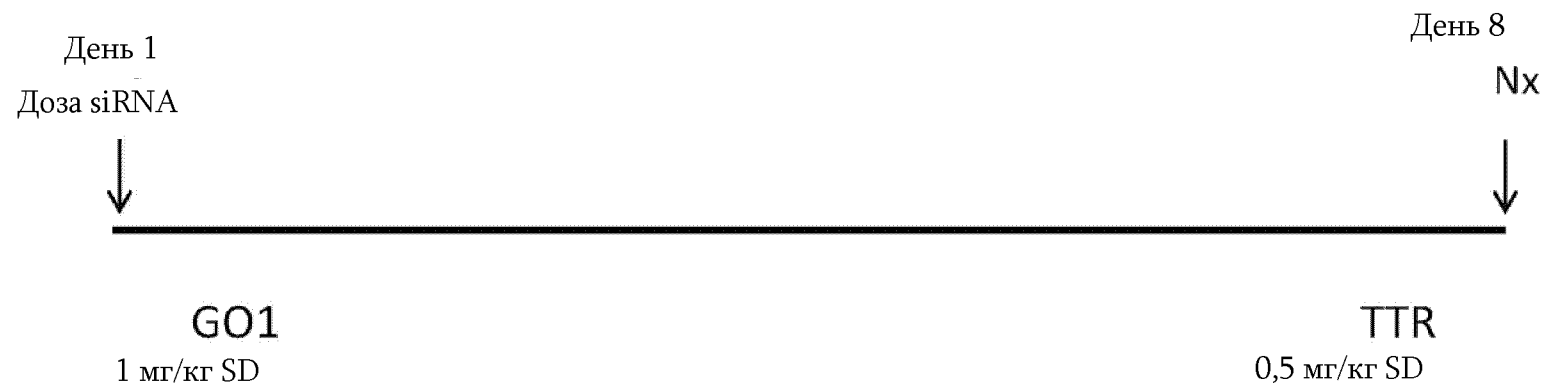


21/61

ФИГ. 21



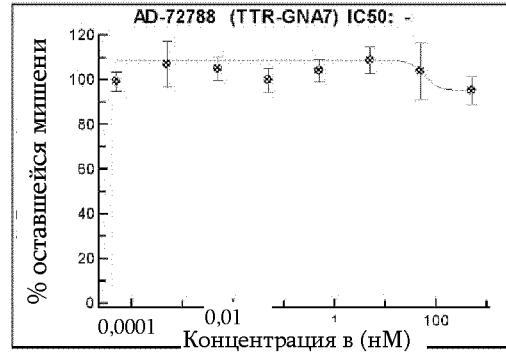
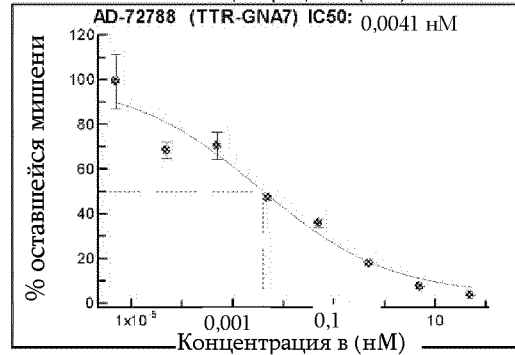
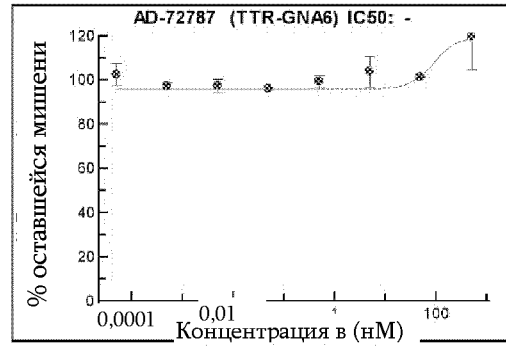
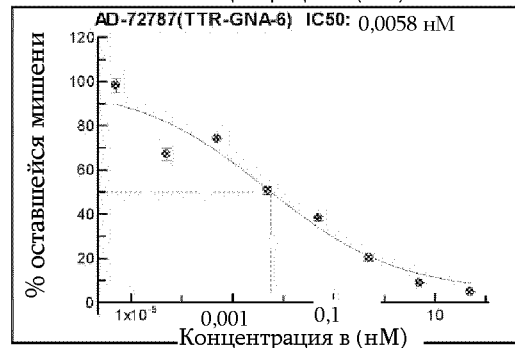
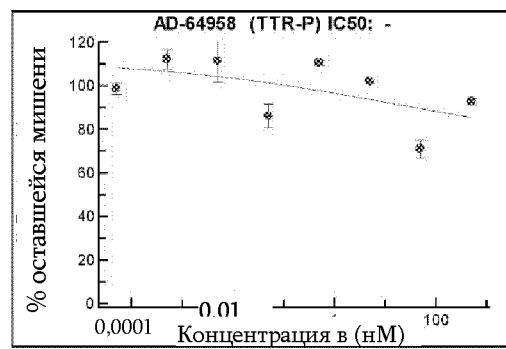
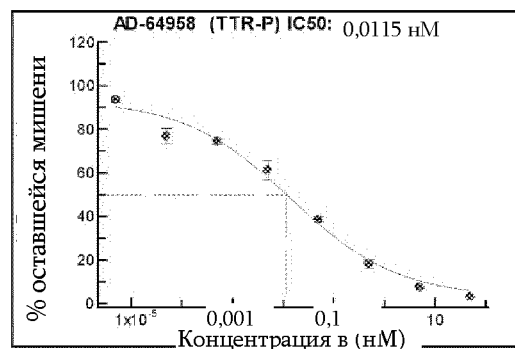
ФИГ. 22



ФИГ. 23

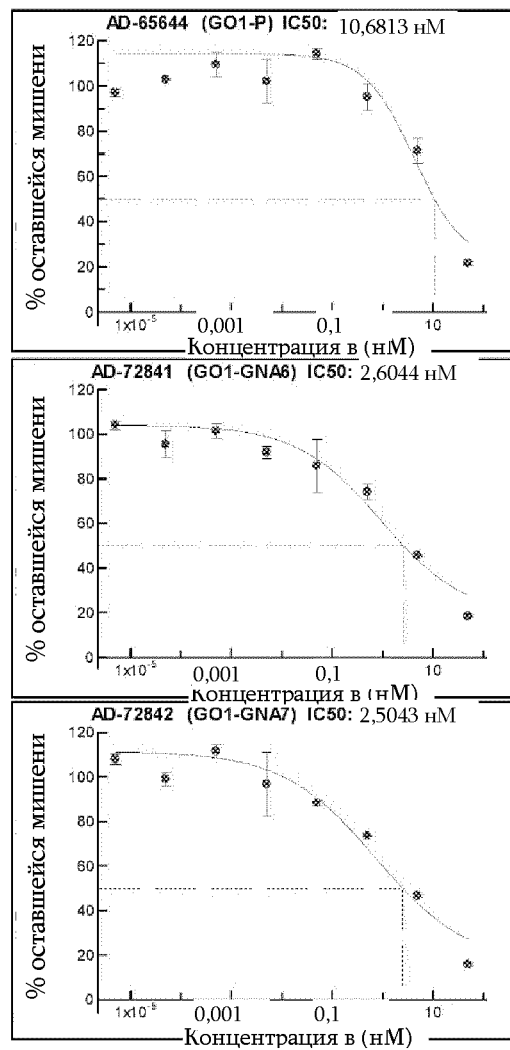
Целевая

Нецелевая

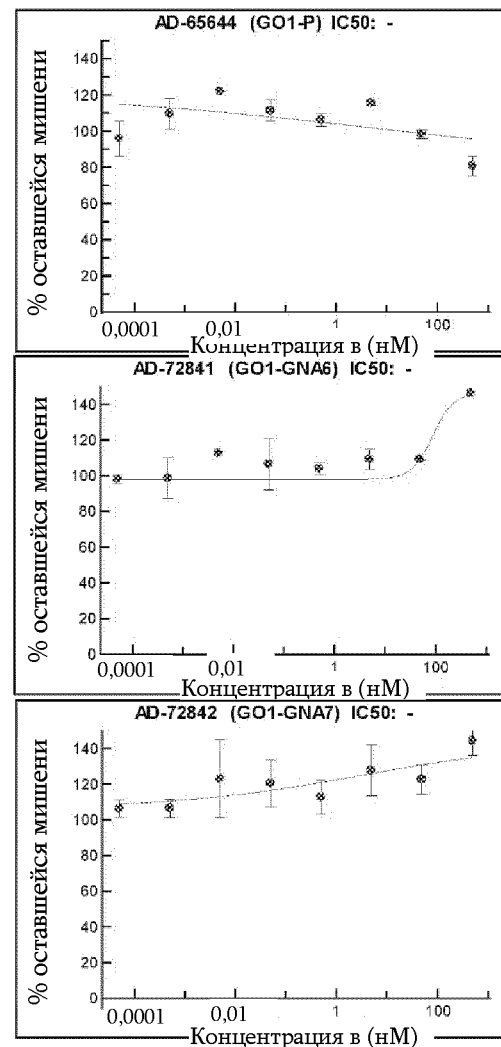


ФИГ. 24

Целевая

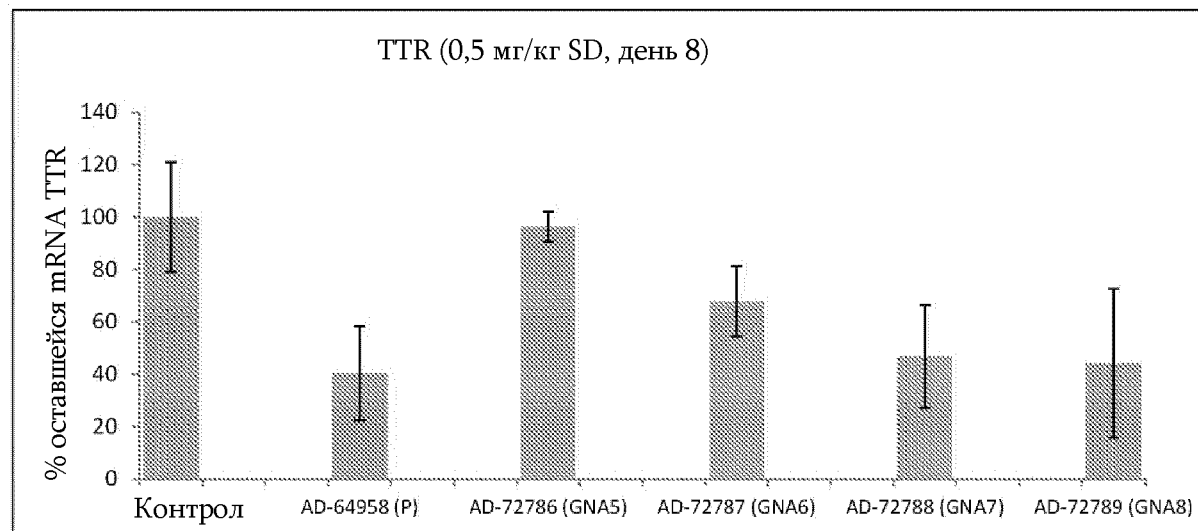


Нецелевая

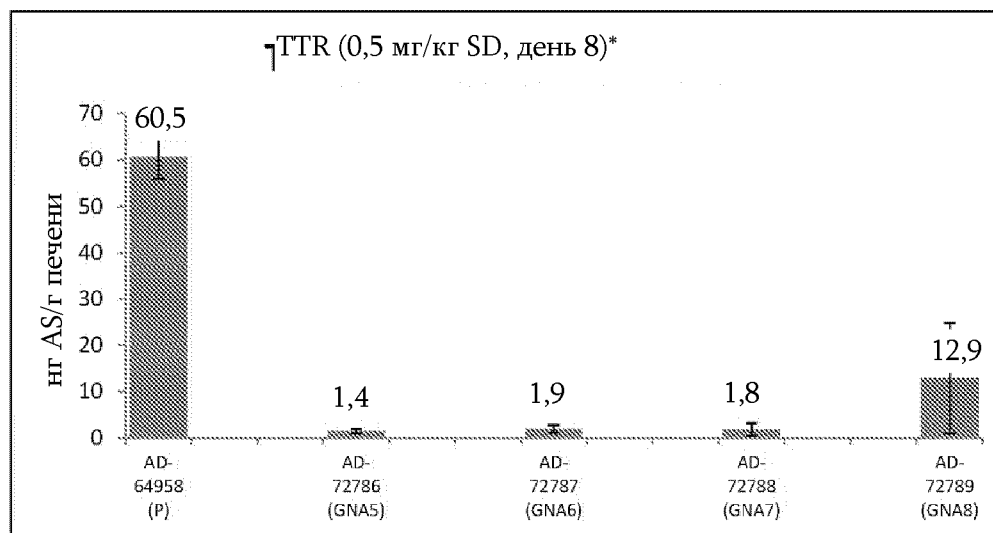


ФИГ. 25

PD

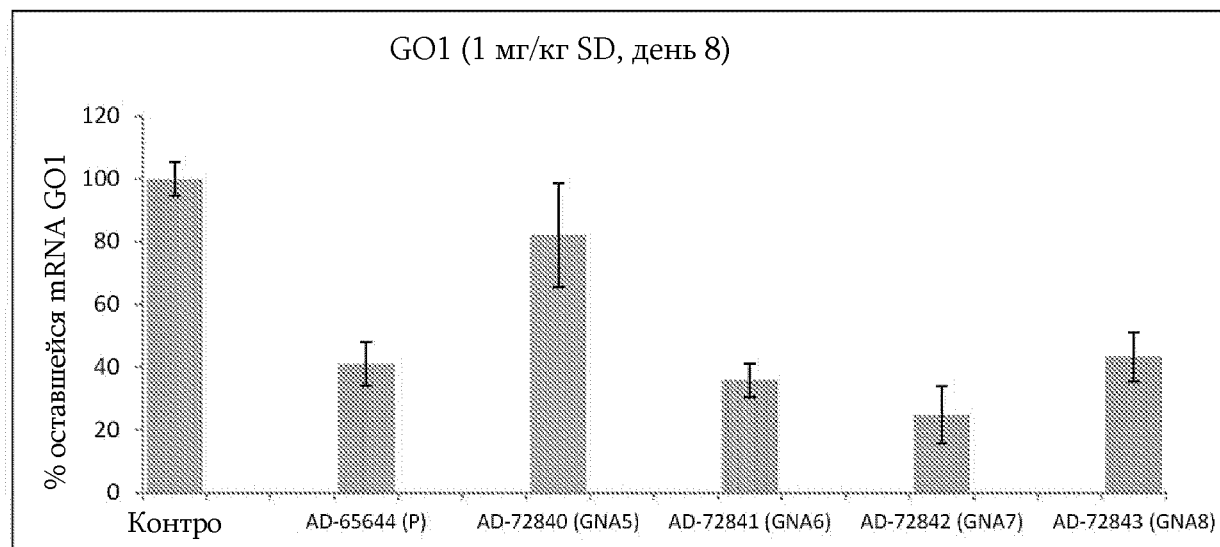


Накопление
исследуемого
вещества в
печени

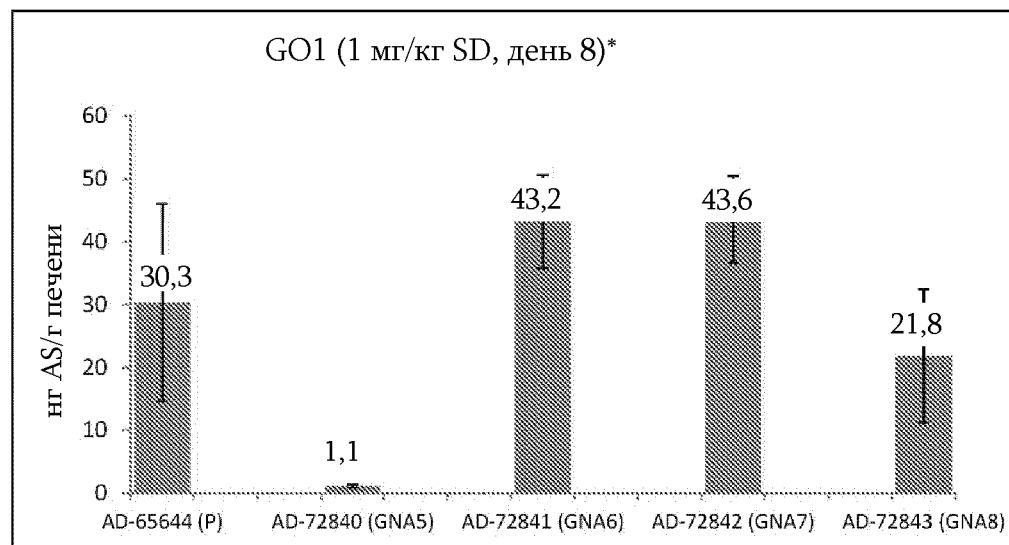


ФИГ. 26

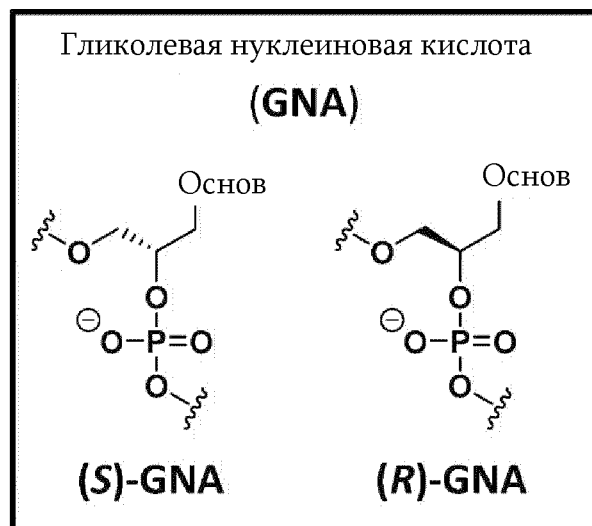
PD



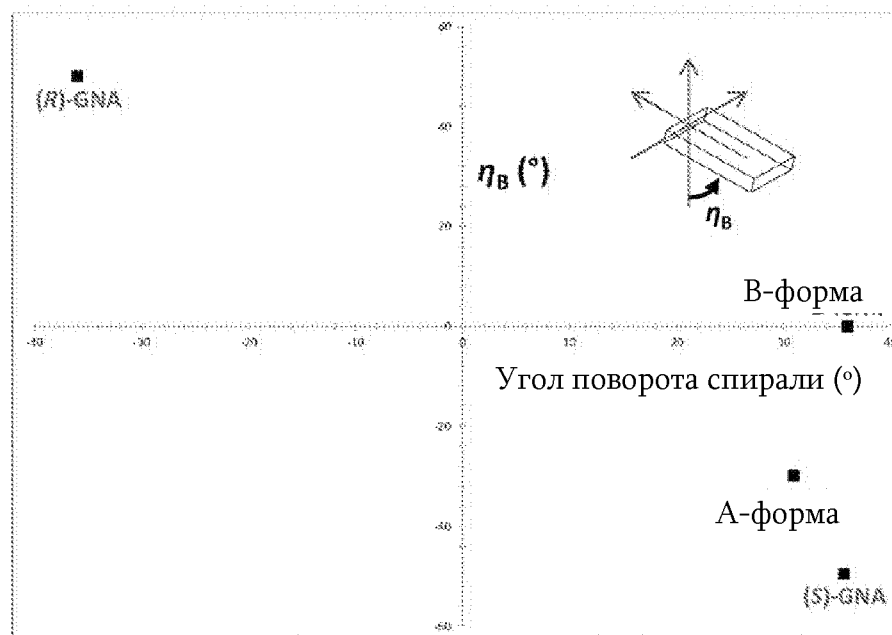
Накопление
исследуемого
вещества в
печени



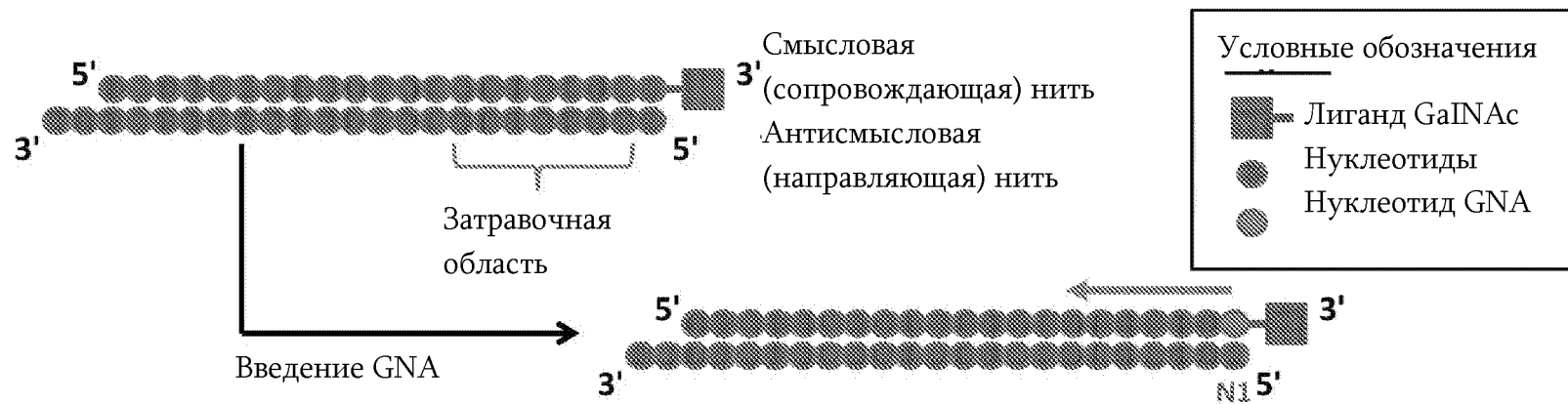
ФИГ. 27



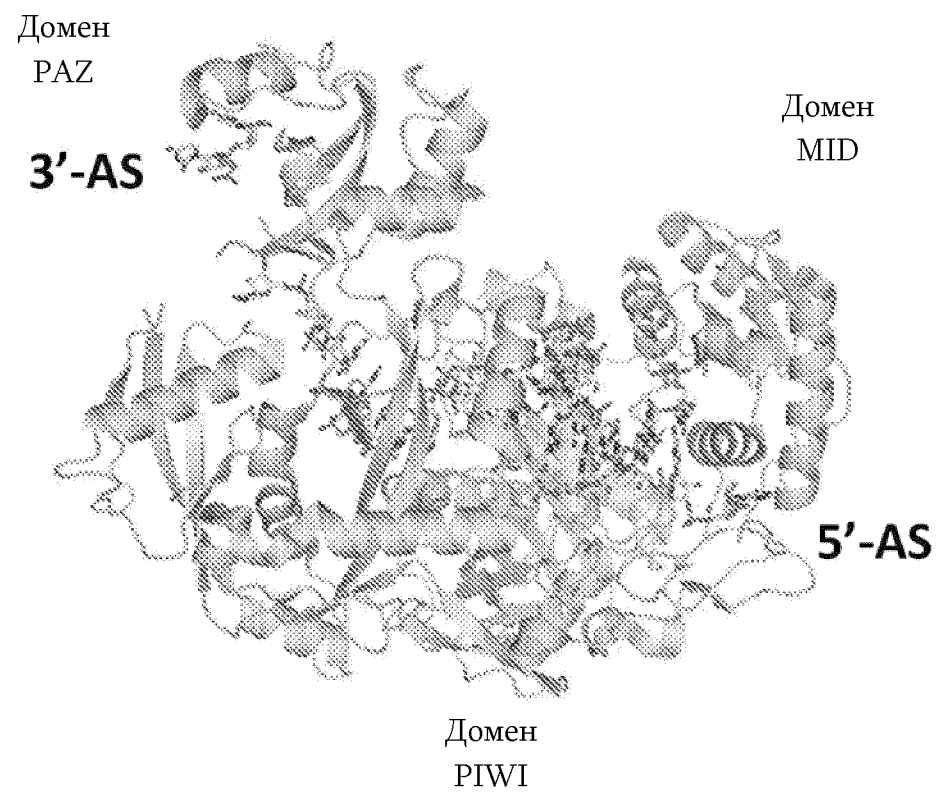
ФИГ. 28



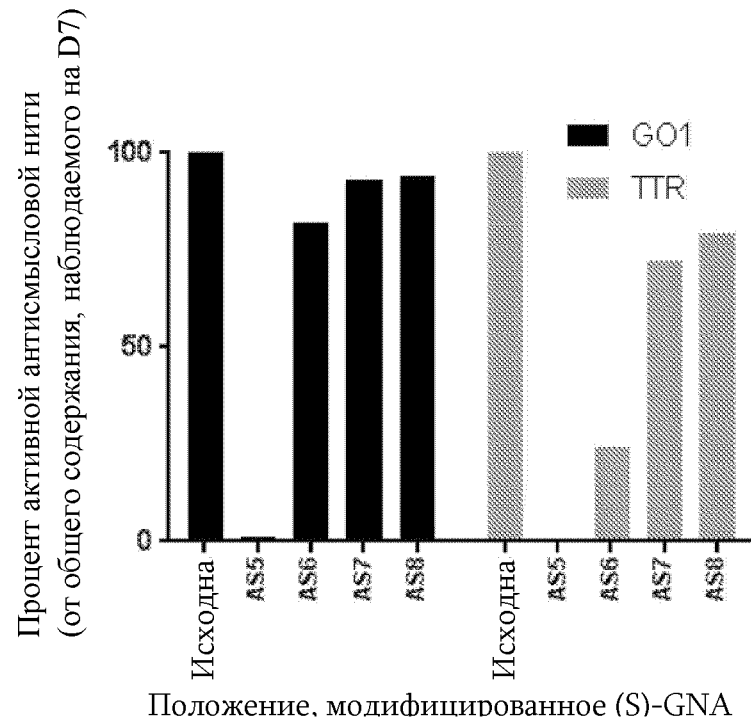
ФИГ. 29



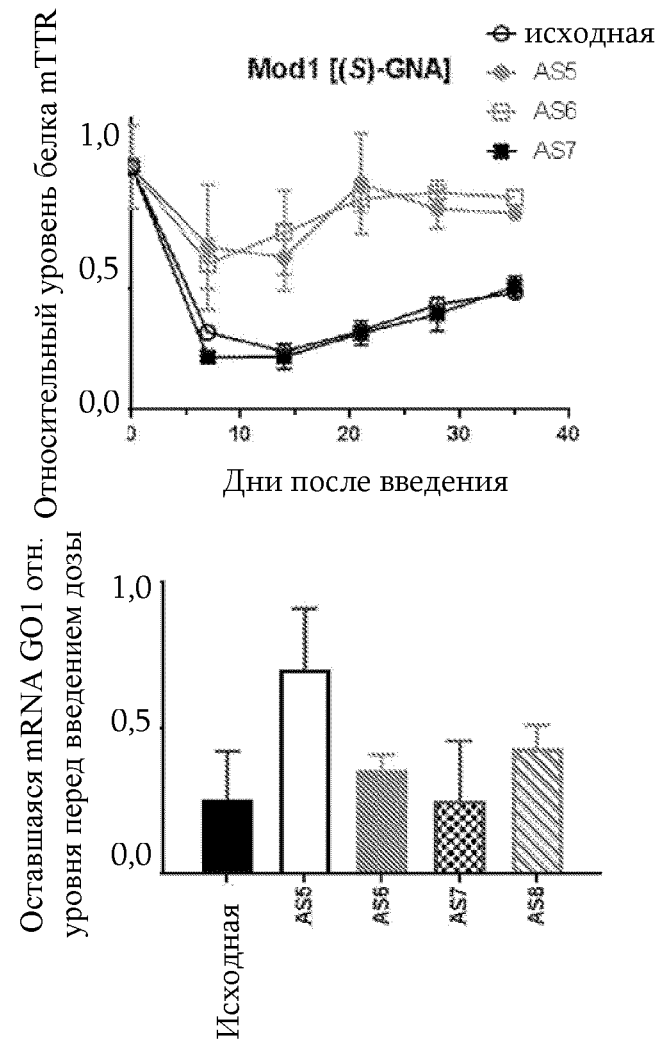
ФИГ. 30



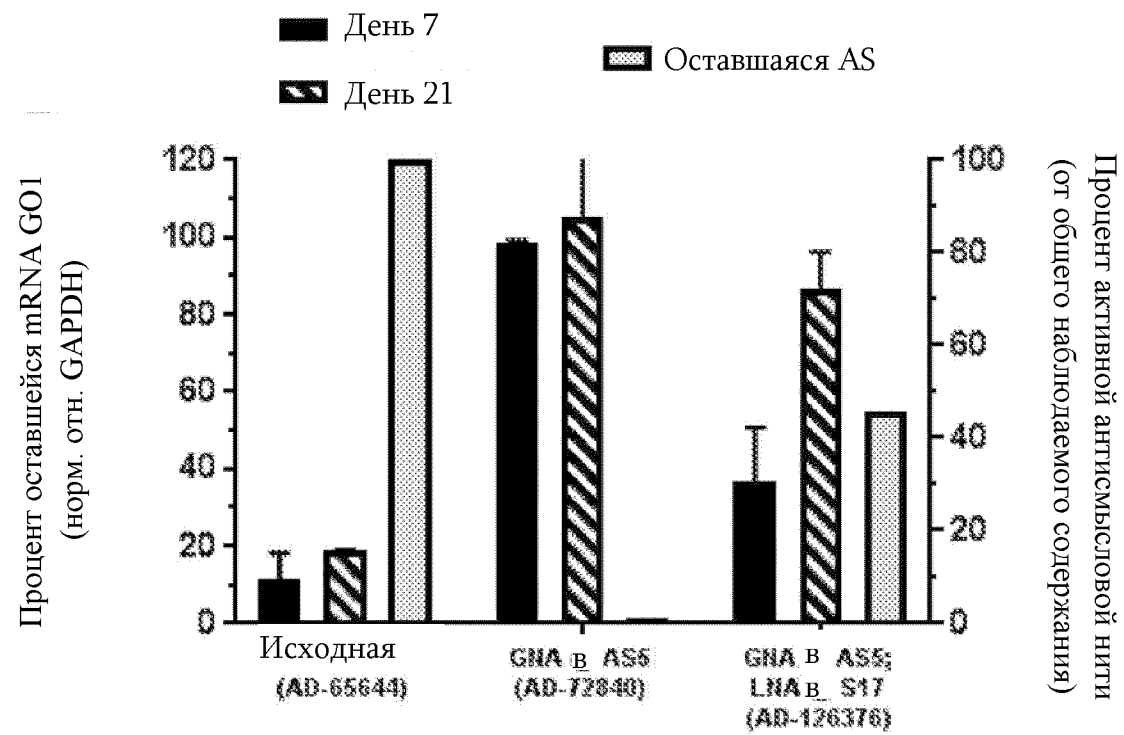
ФИГ. 31



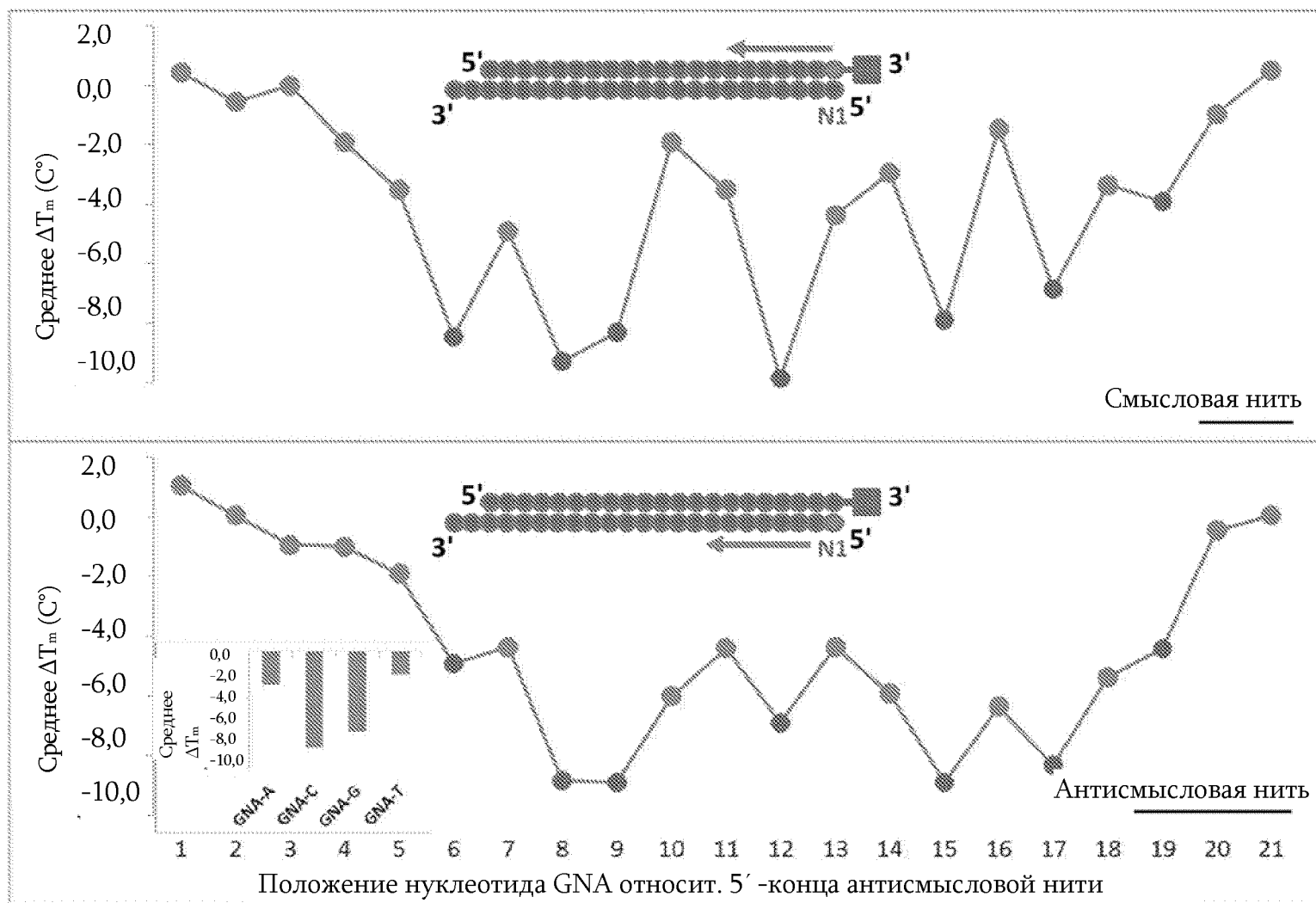
ФИГ. 32А



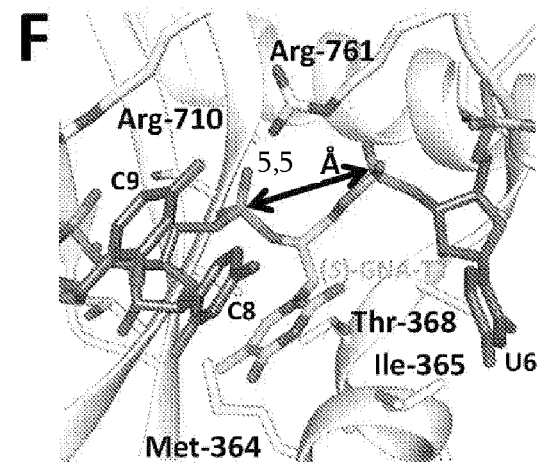
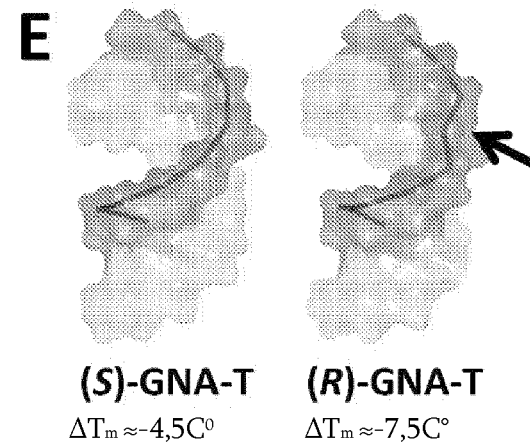
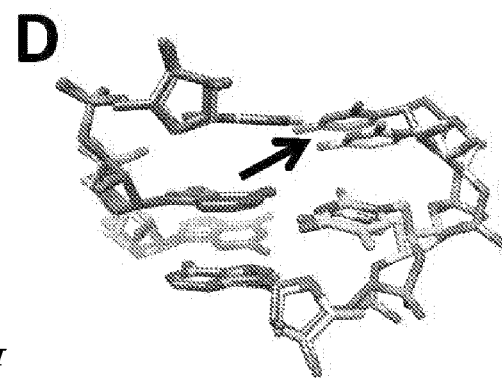
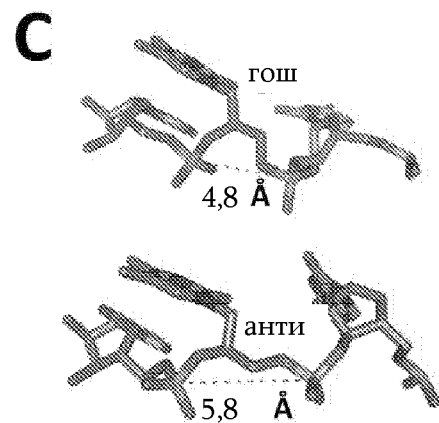
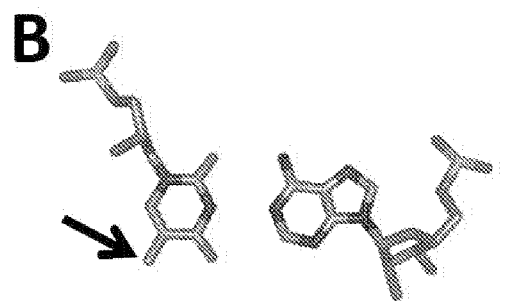
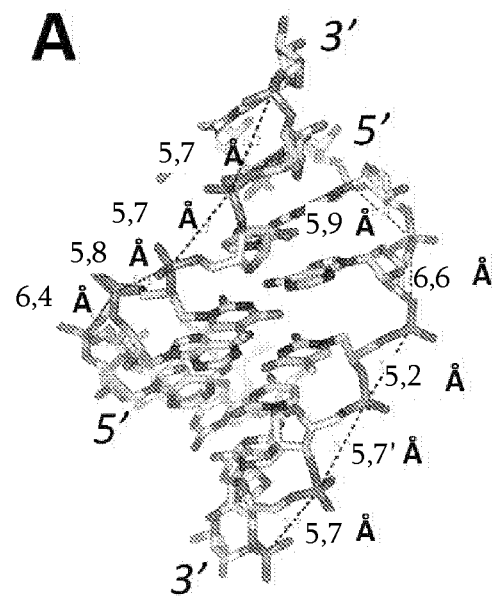
ФИГ. 32В



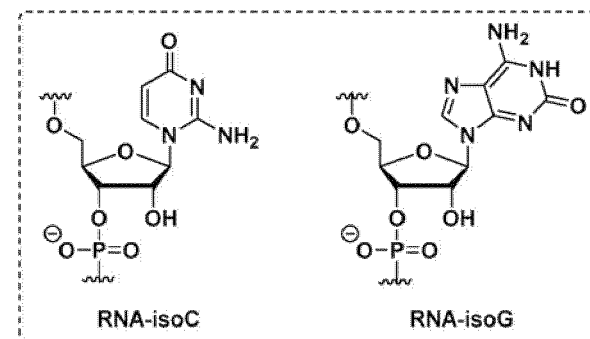
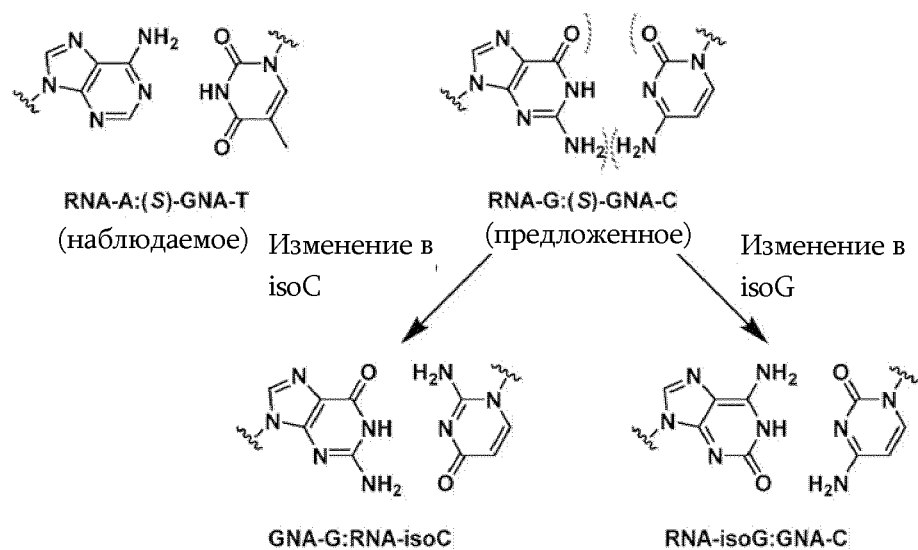
ФИГ. 32С



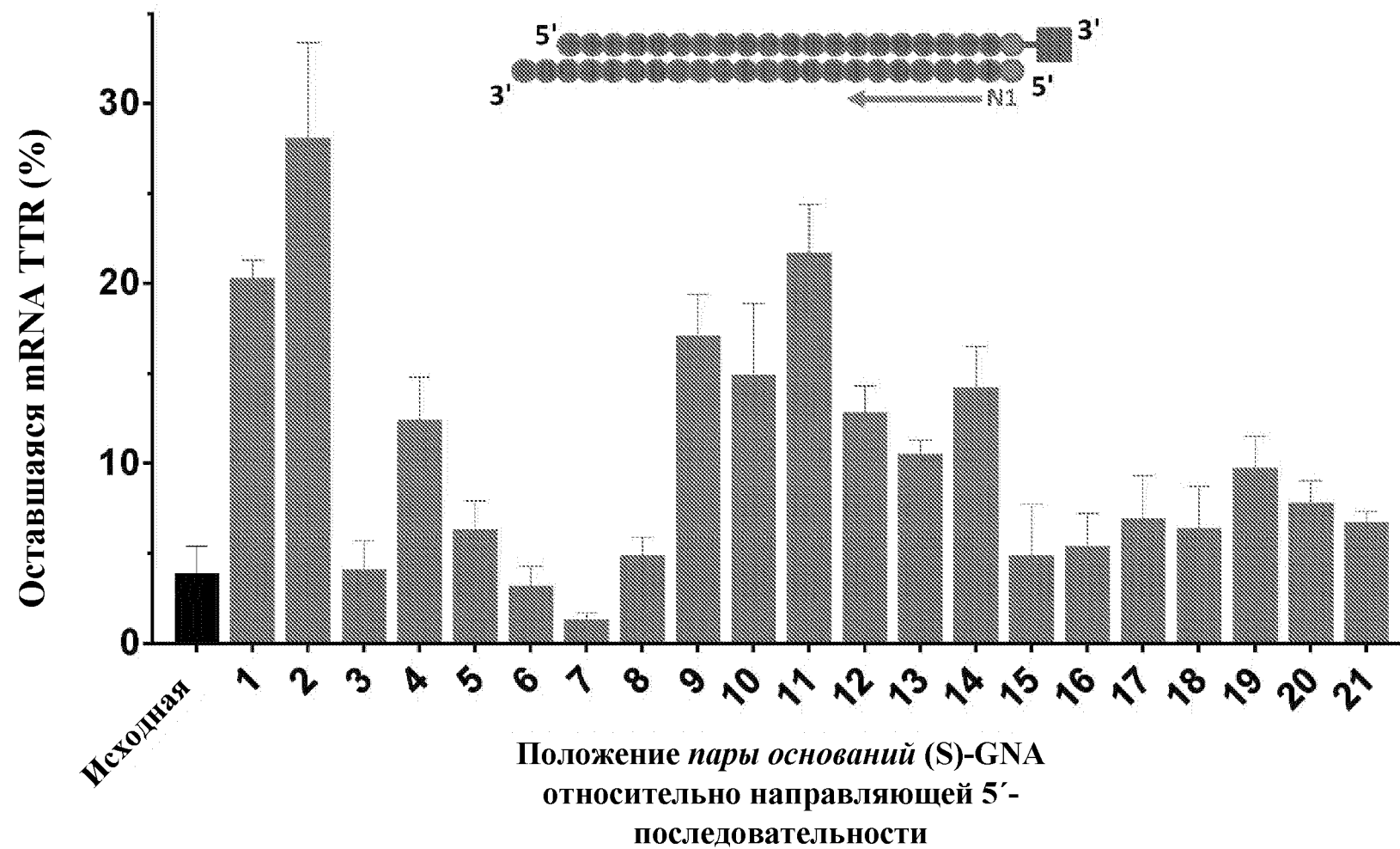
ФИГ. 33



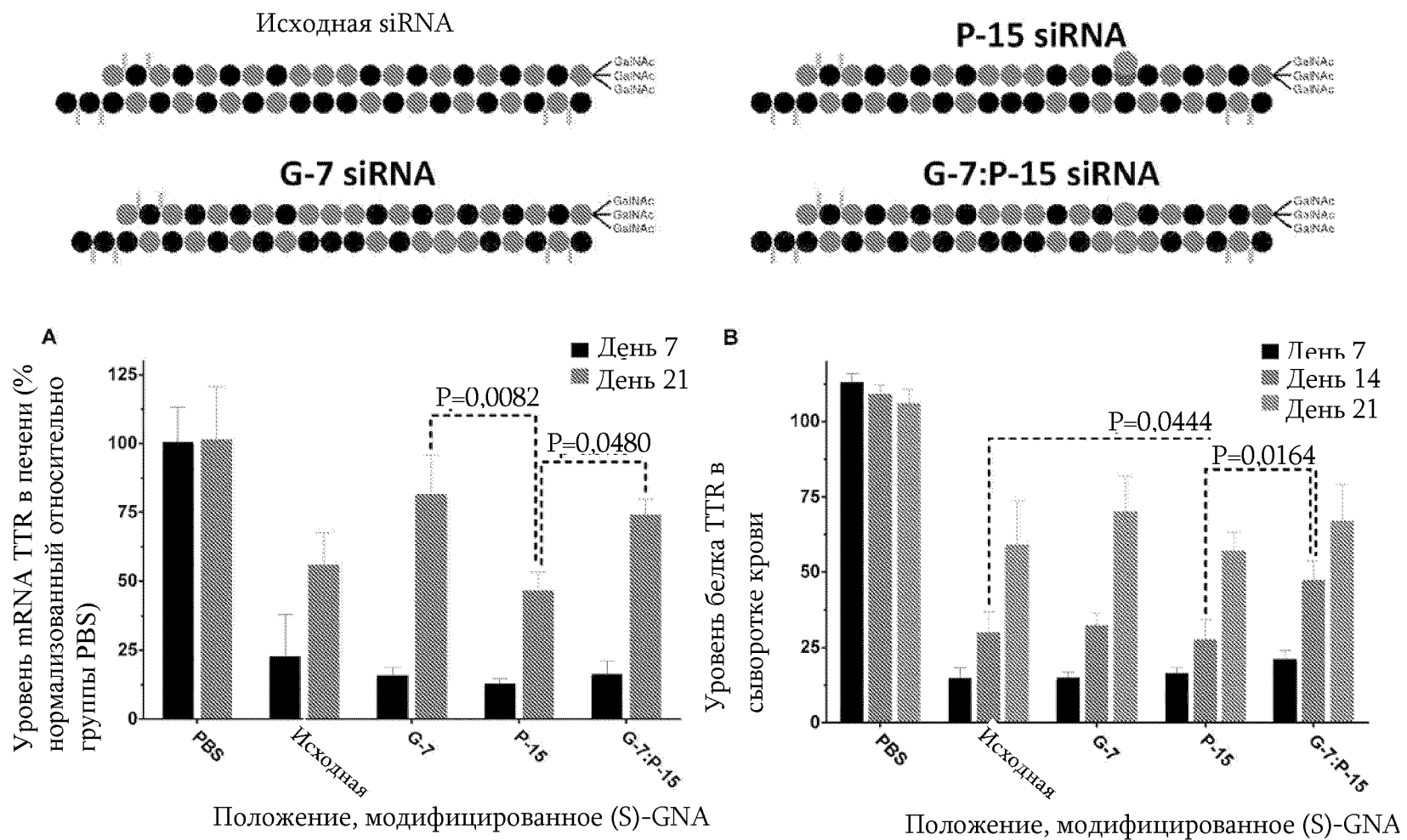
ФИГ. 34A-34F



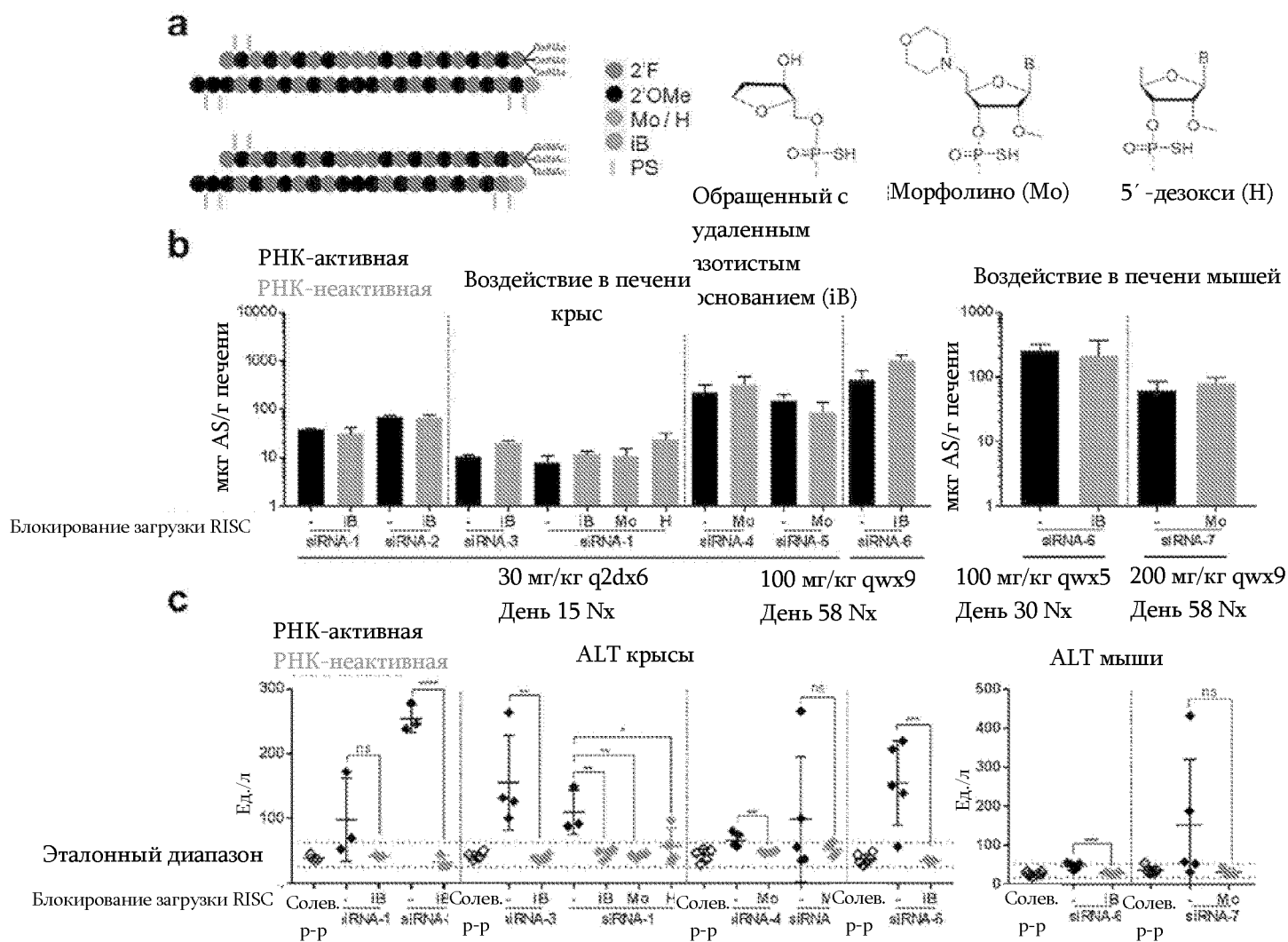
ФИГ. 35



ФИГ. 36



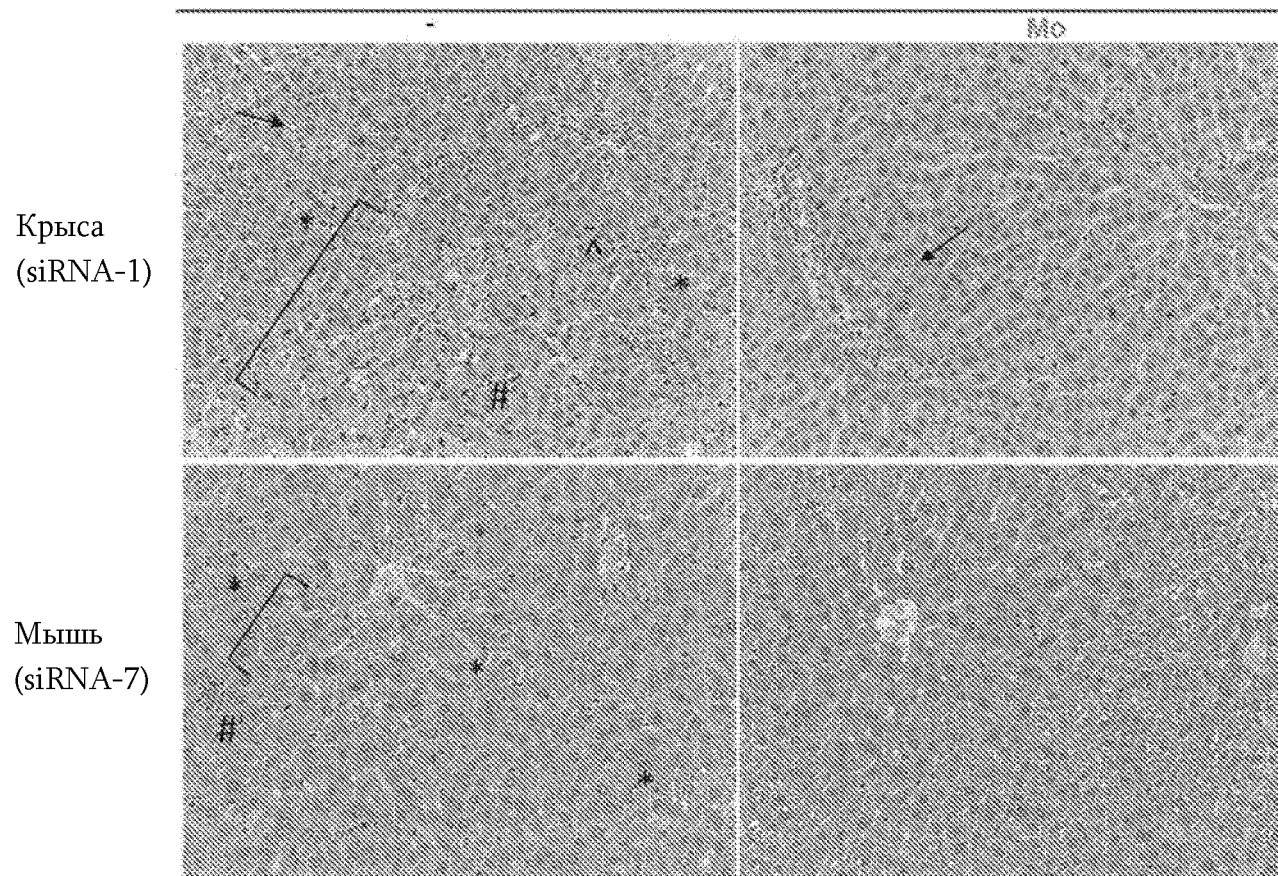
ФИГ. 37А-37В



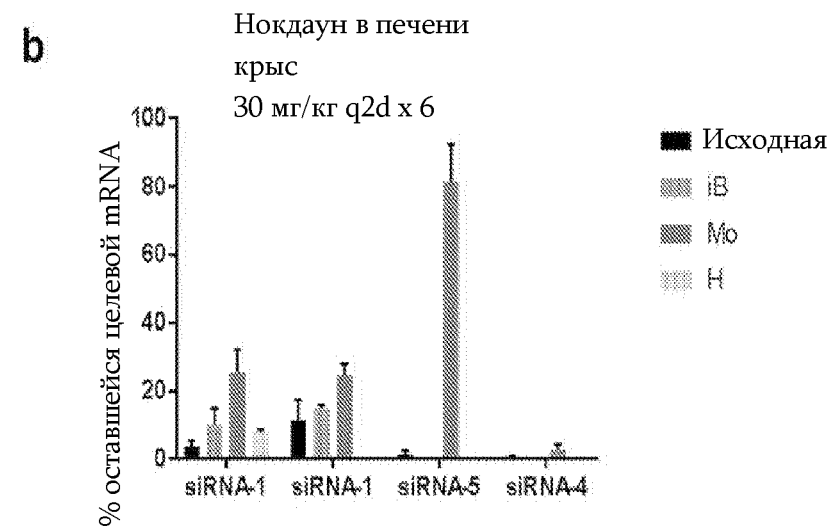
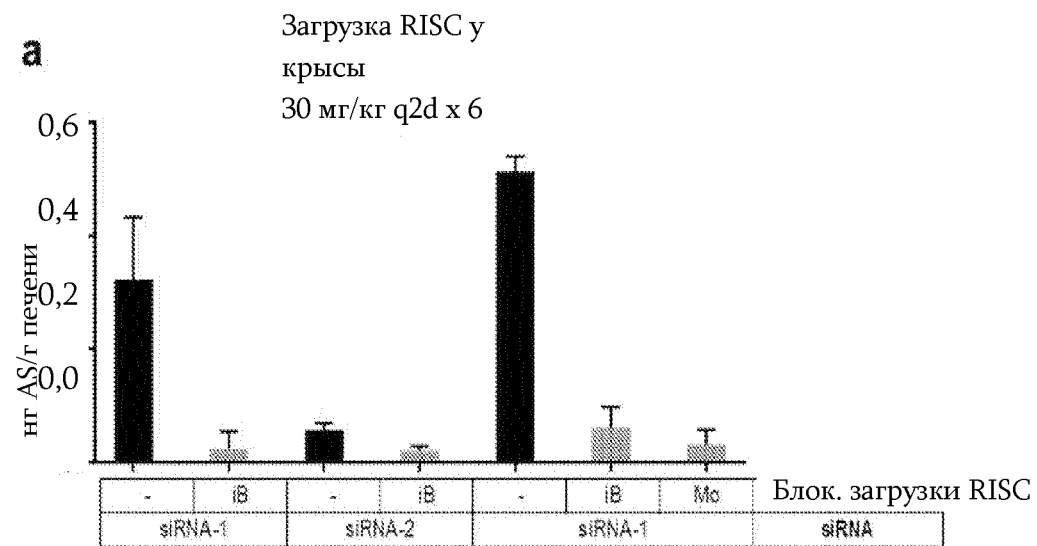
ФИГ. 38А-38С

d

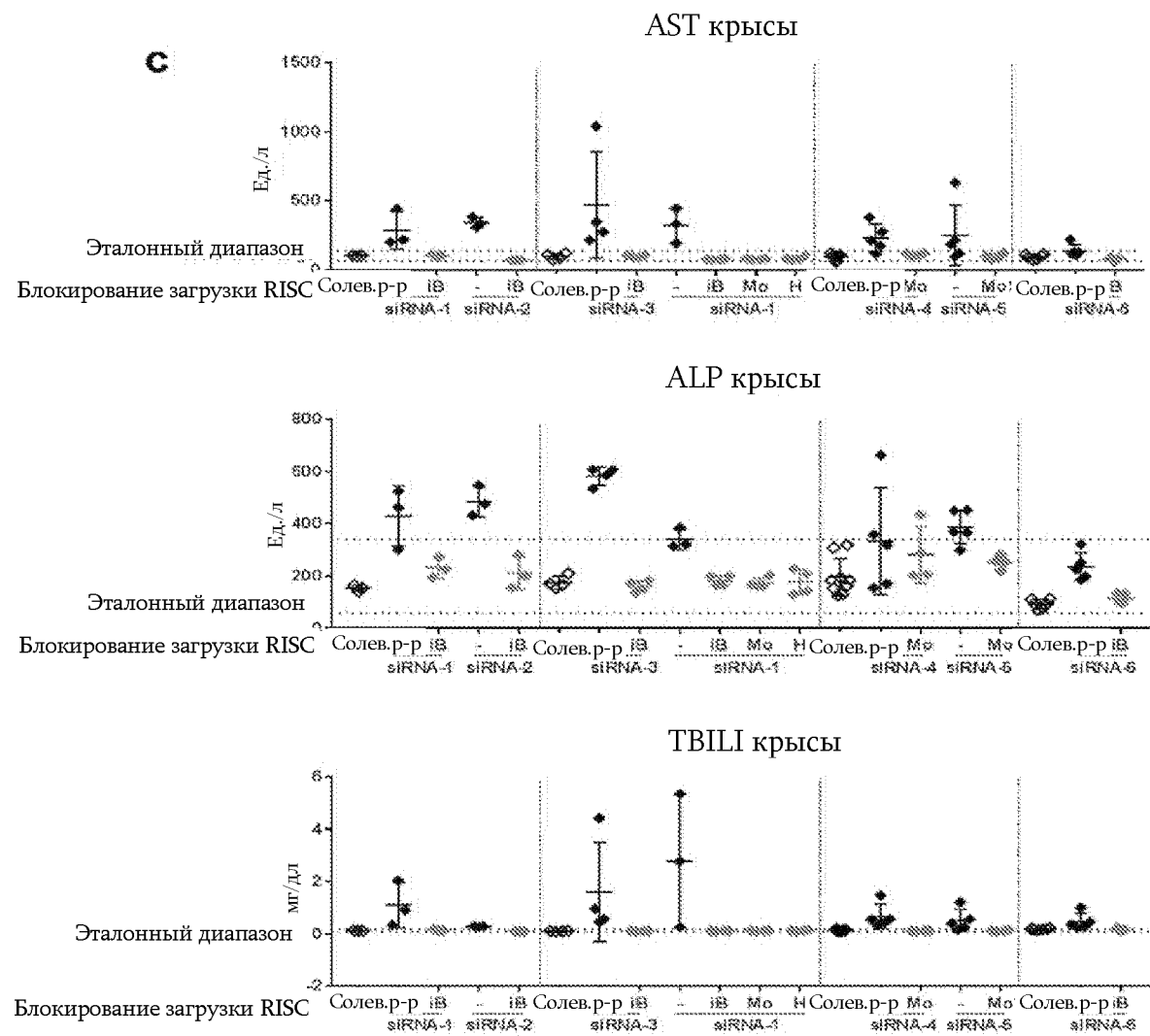
Блокирование загрузки RISC



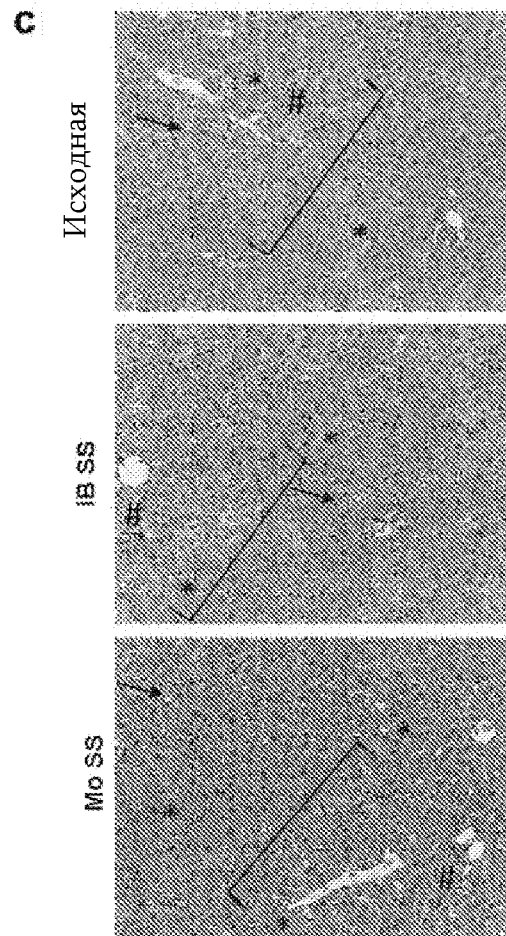
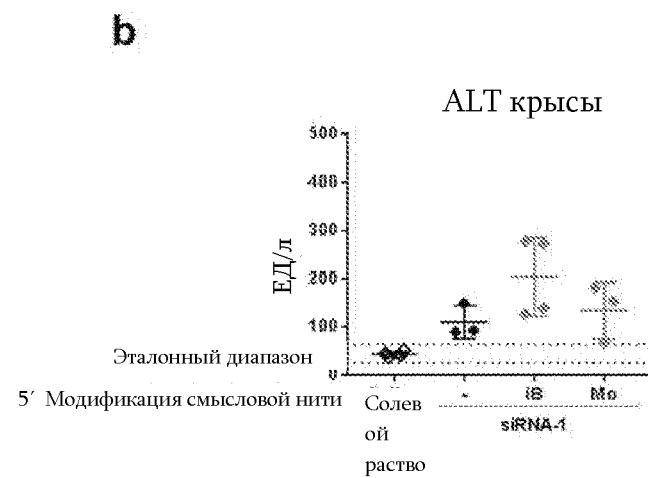
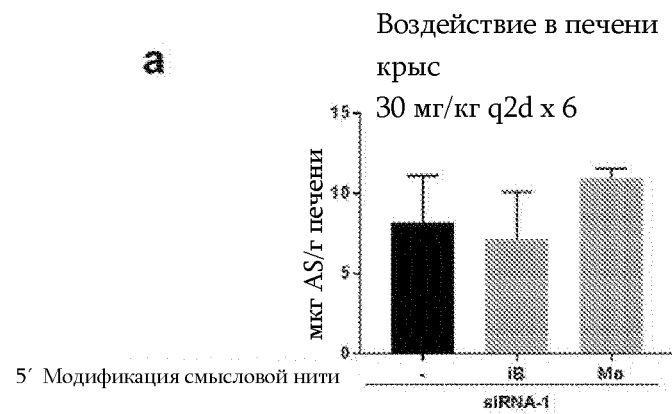
ФИГ. 38D



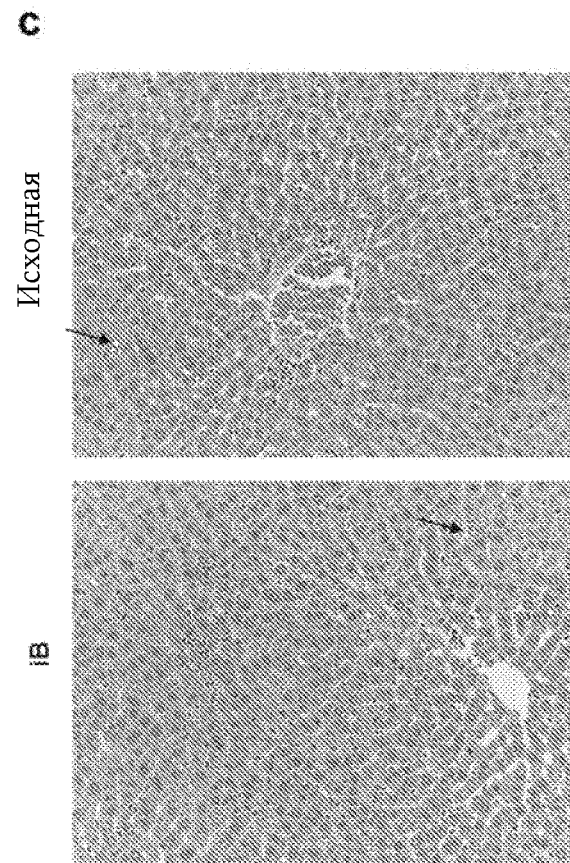
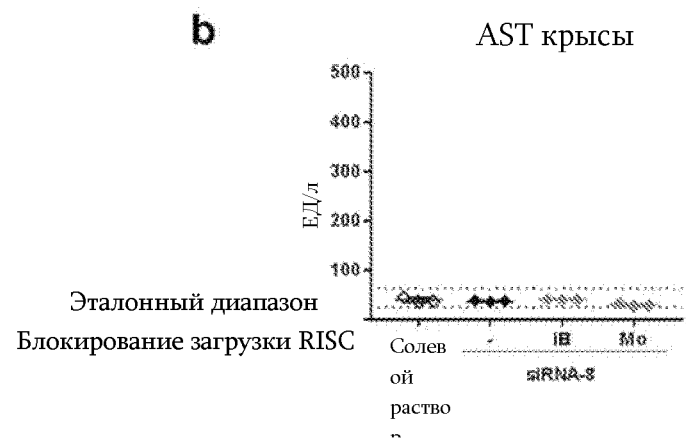
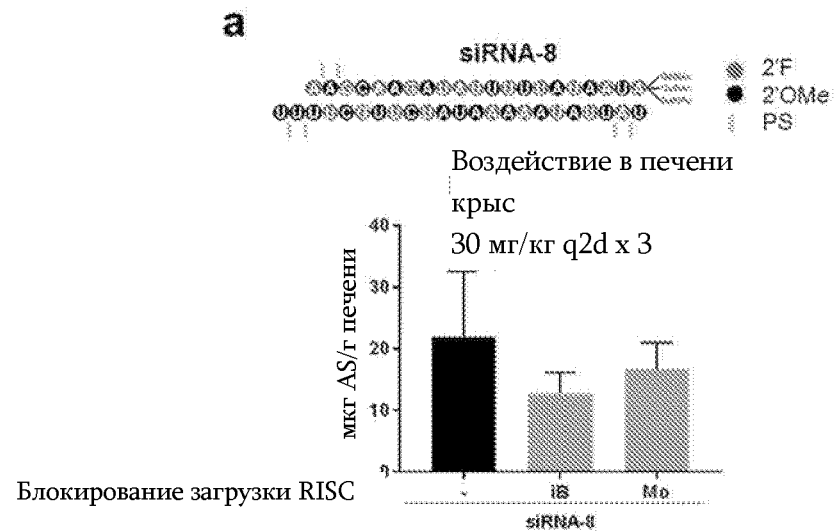
ФИГ. 39А-39В



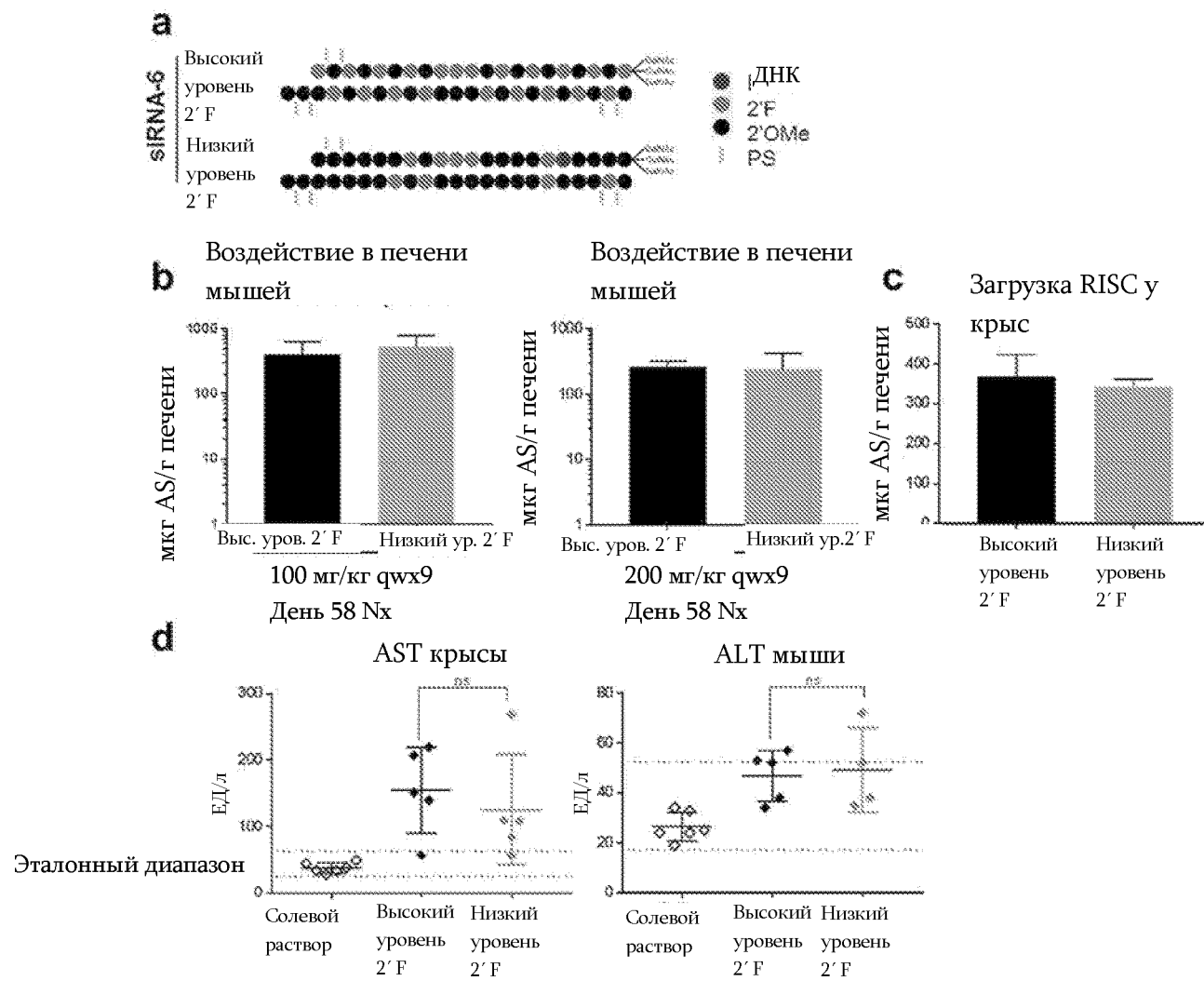
ФИГ. 39С



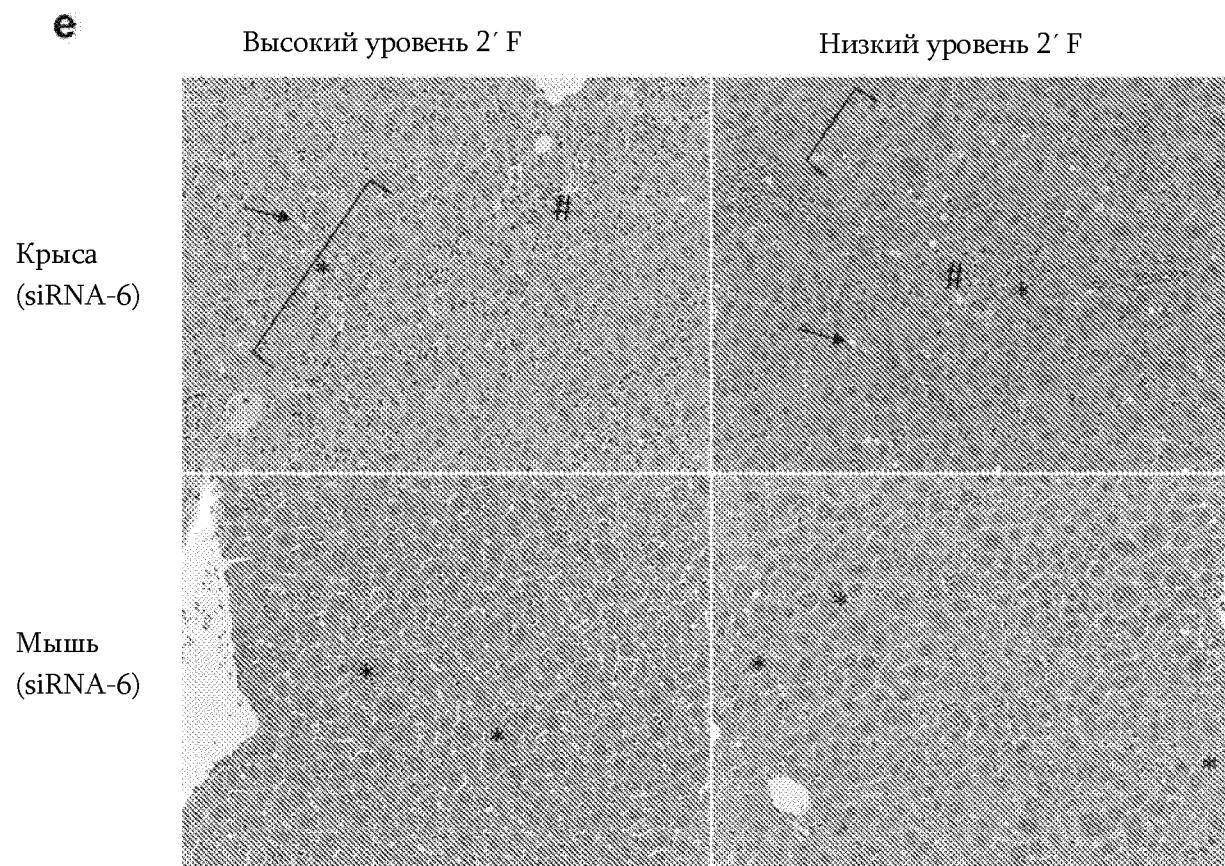
ФИГ. 40А-40С



ФИГ. 41A-41C

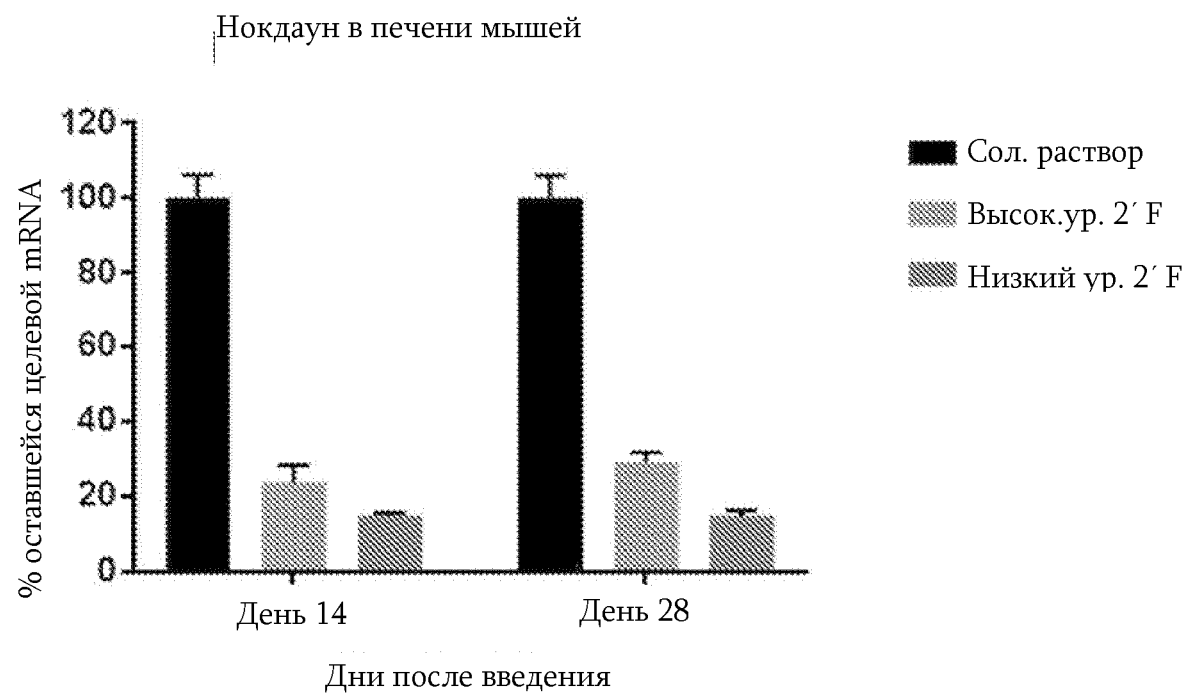


ФИГ. 42A-42D

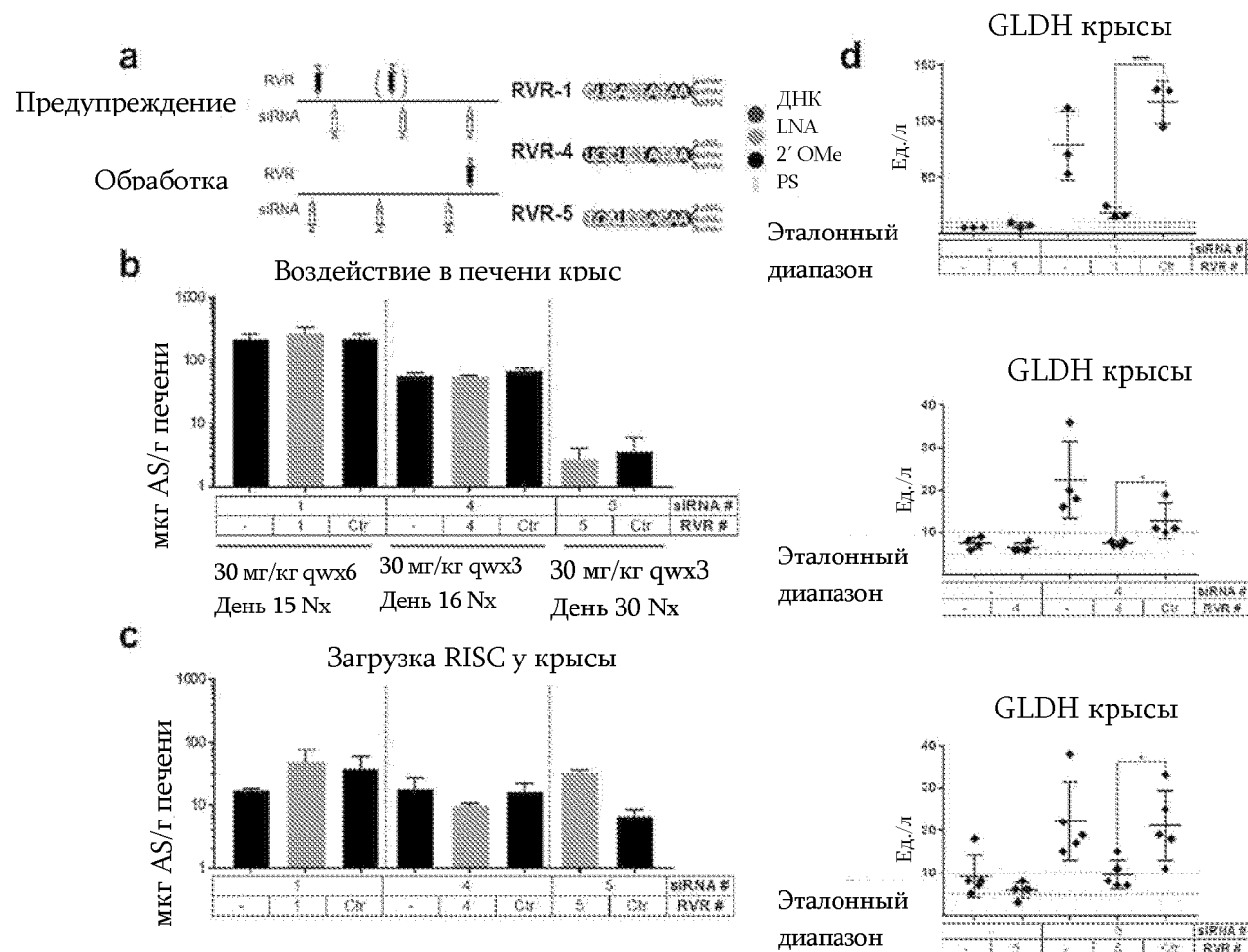


45/61

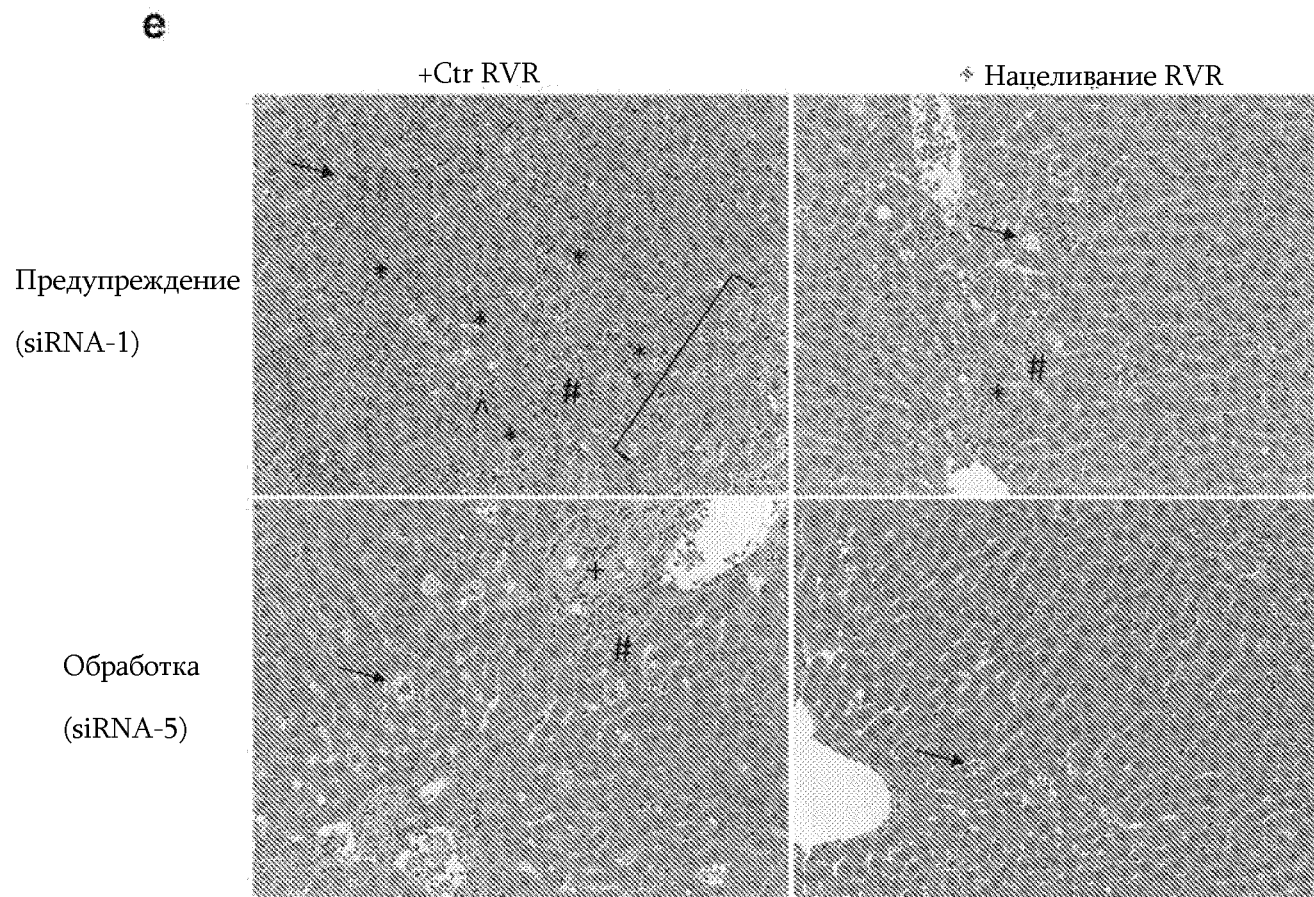
ФИГ. 42E



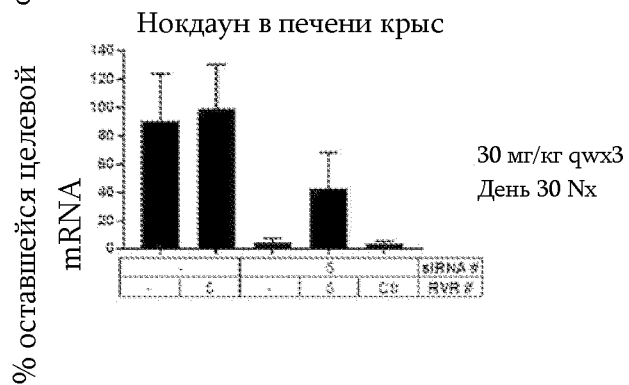
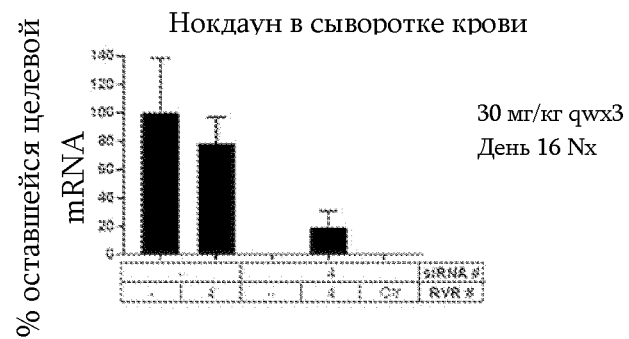
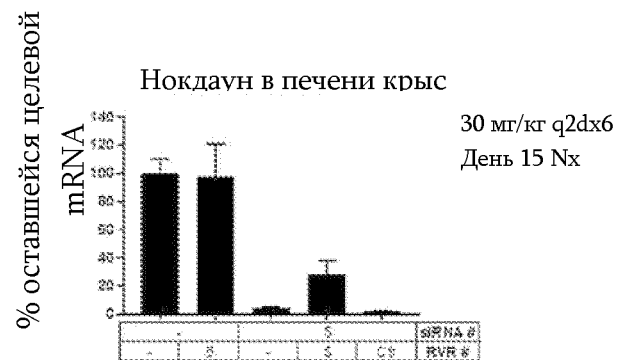
ФИГ. 43



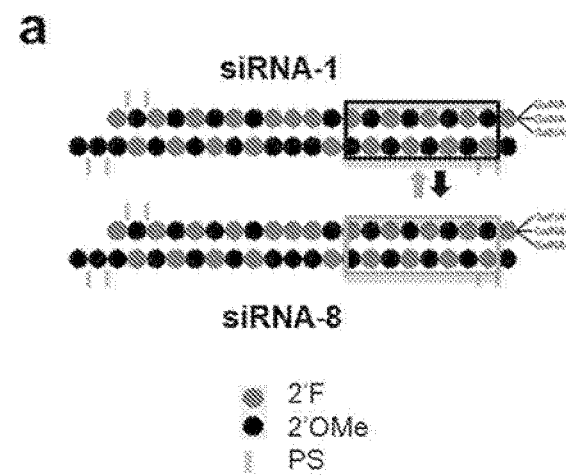
ФИГ. 44А-44D



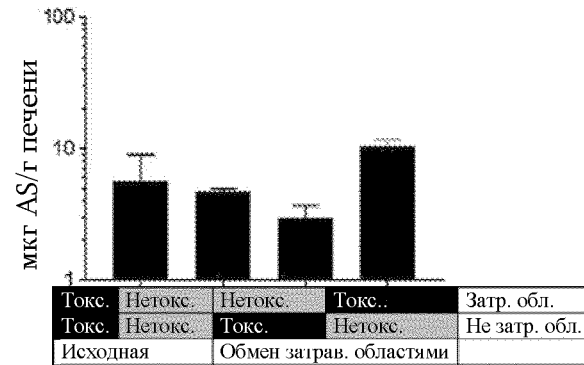
ФИГ. 44E



ФИГ. 45

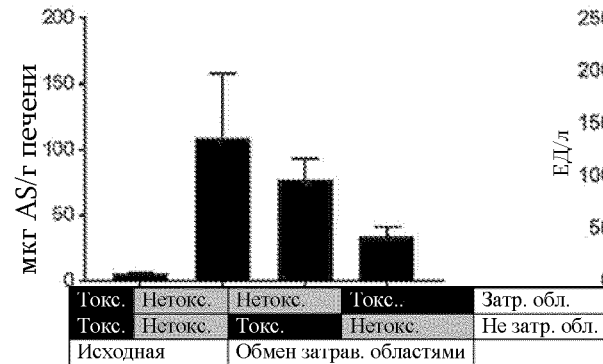


b Воздействие в печени крыс

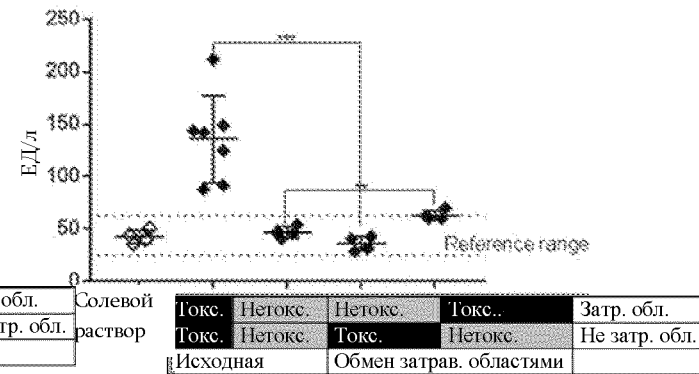


30 мг/кг q2dx6
День 15 Nx

c Загрузка RISC у крысы

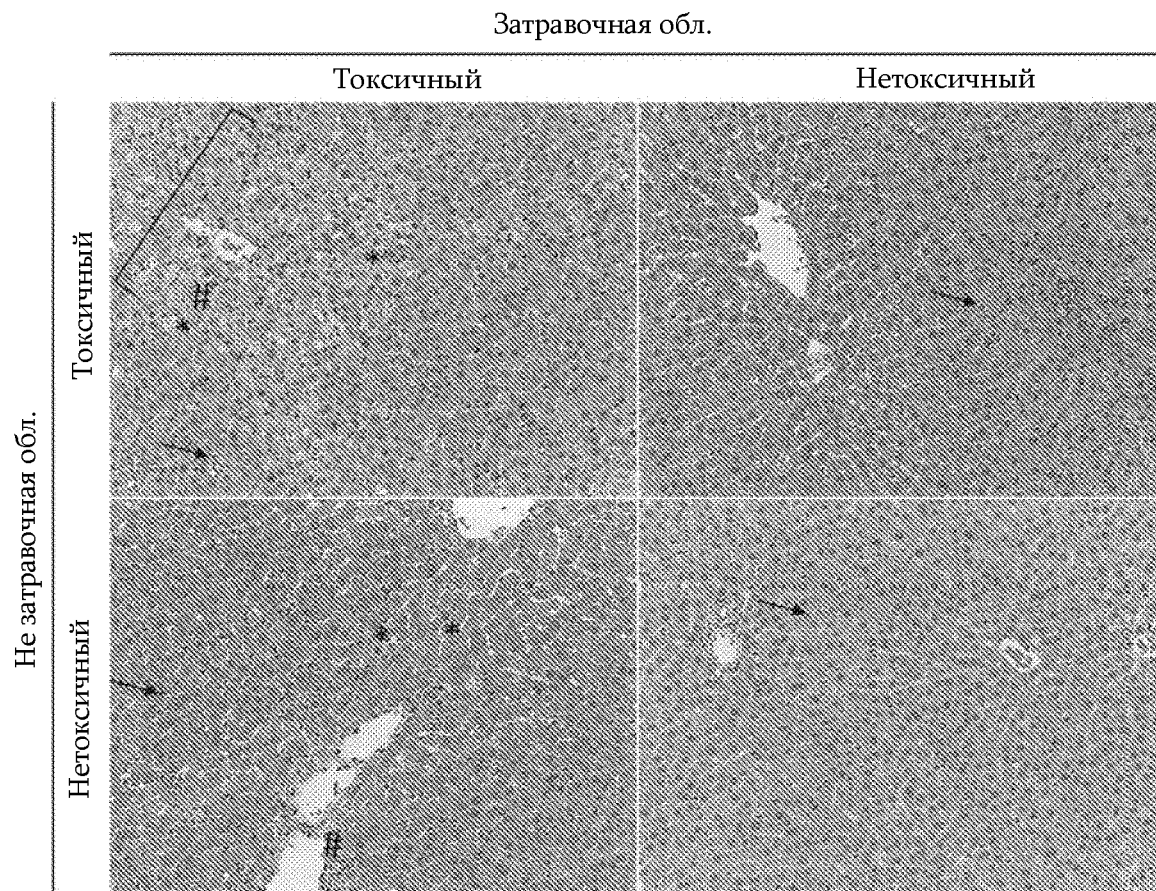


d ALT крысы



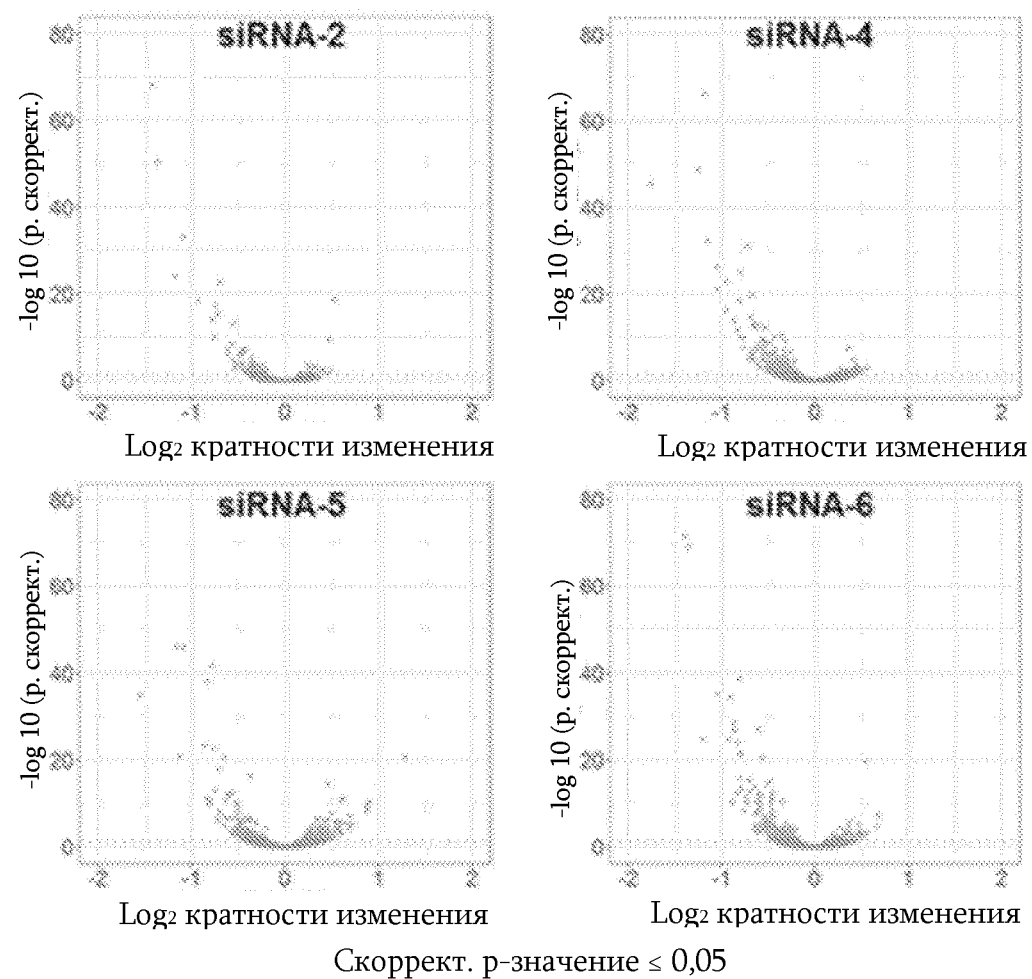
ФИГ. 46A-46D

е



ФИГ. 46Е

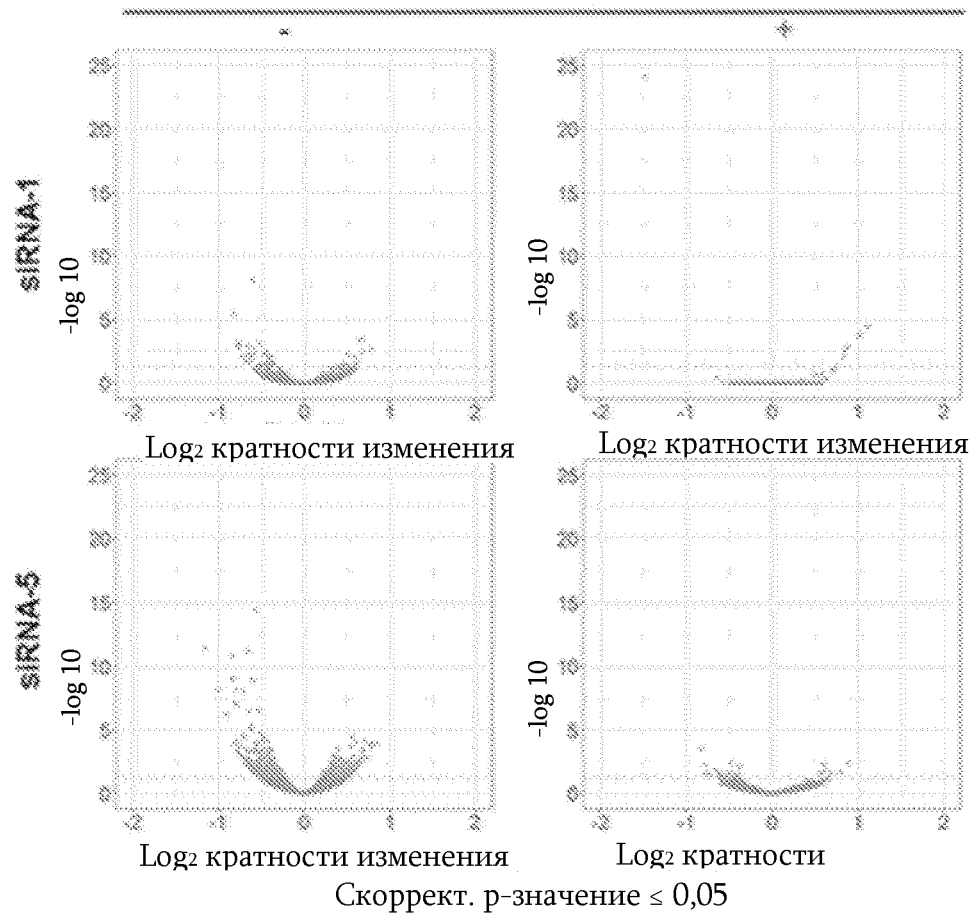
a



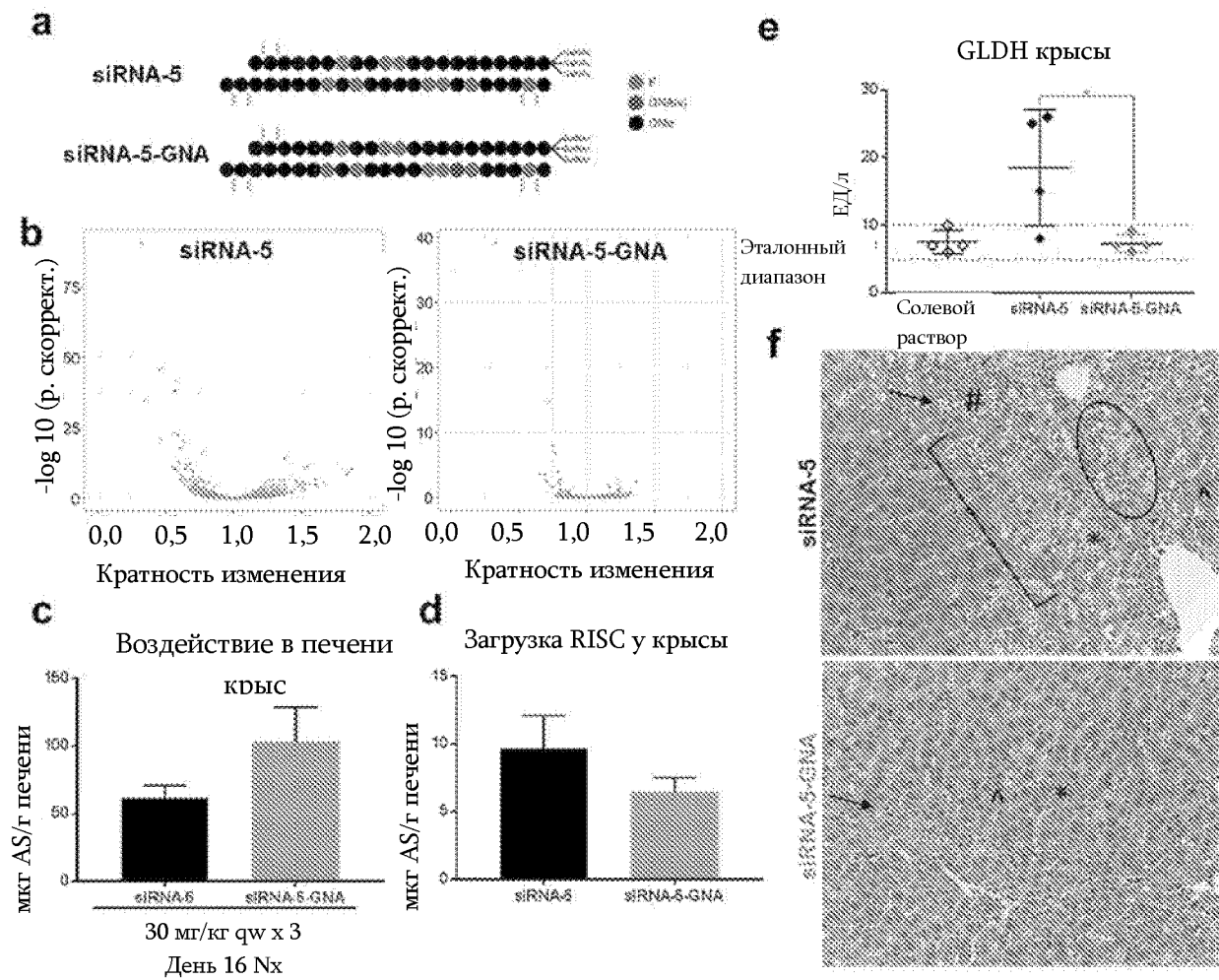
ФИГ. 47А

b

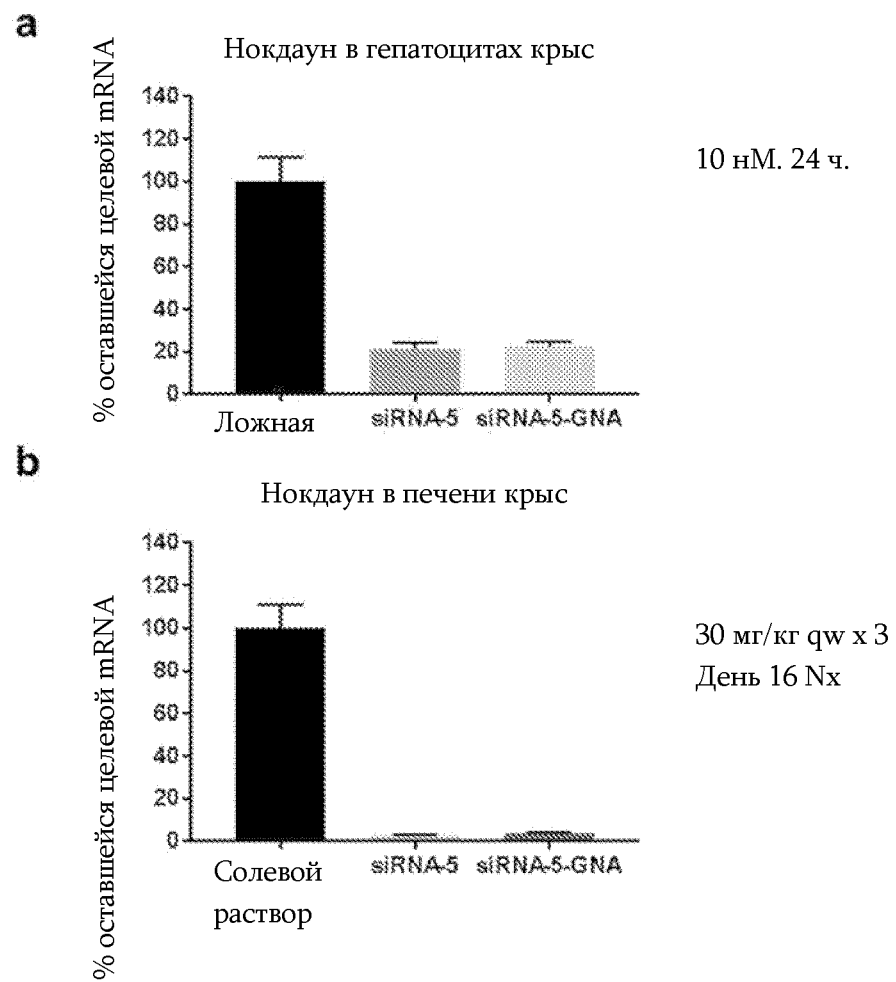
Блокирование загрузки RISC



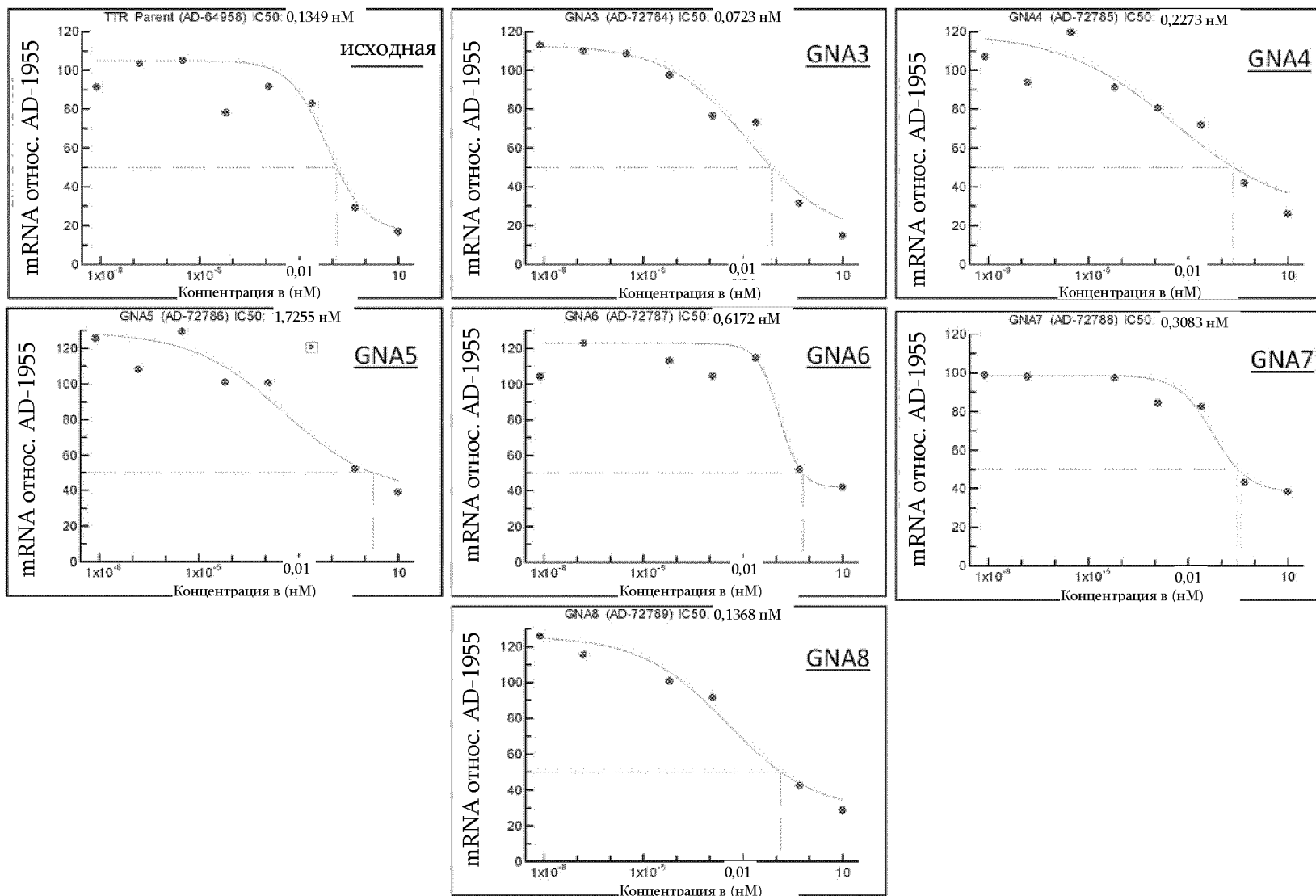
ФИГ. 47В



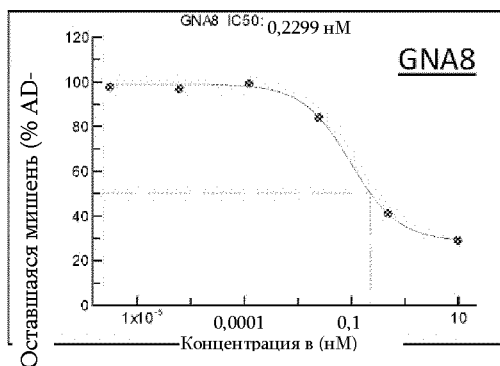
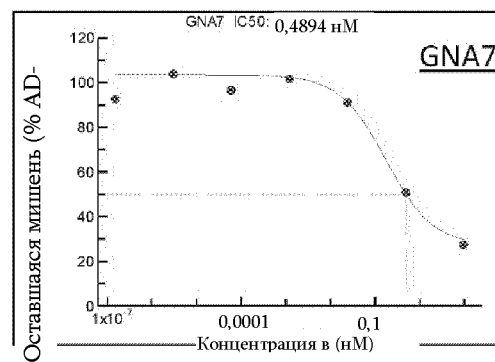
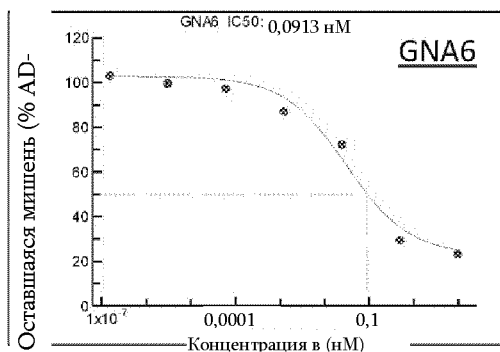
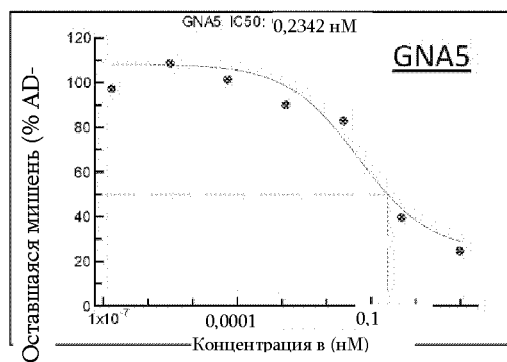
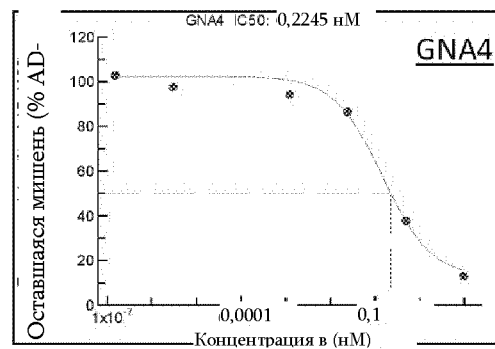
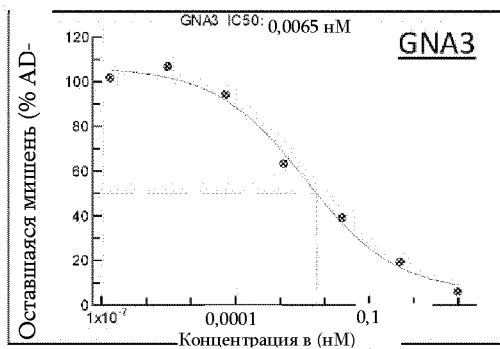
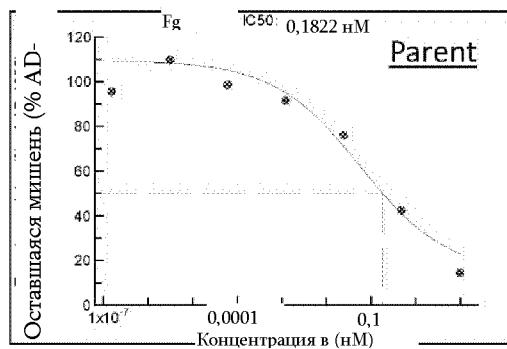
ФИГ. 48А-48F



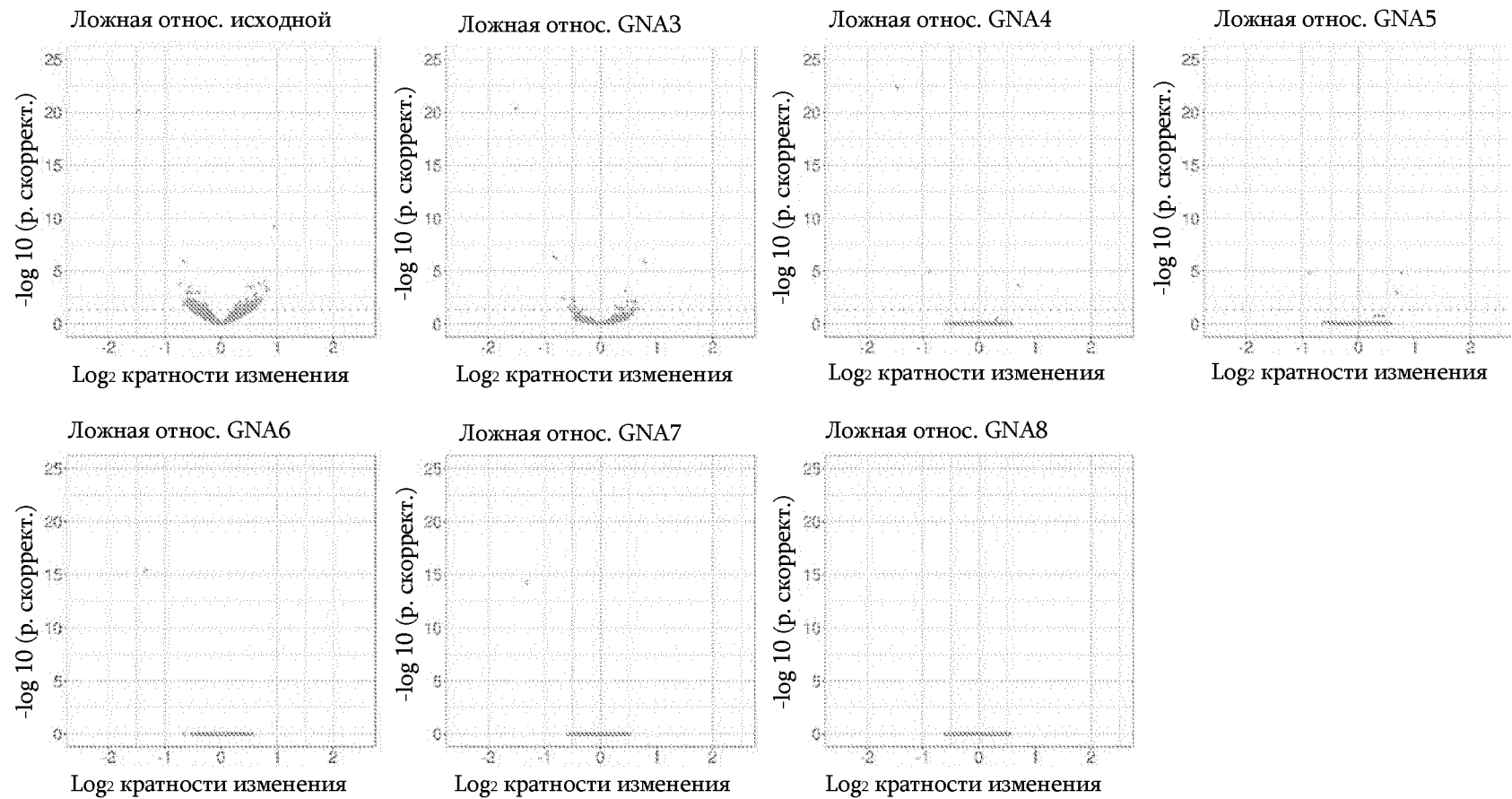
ФИГ. 49А-48В



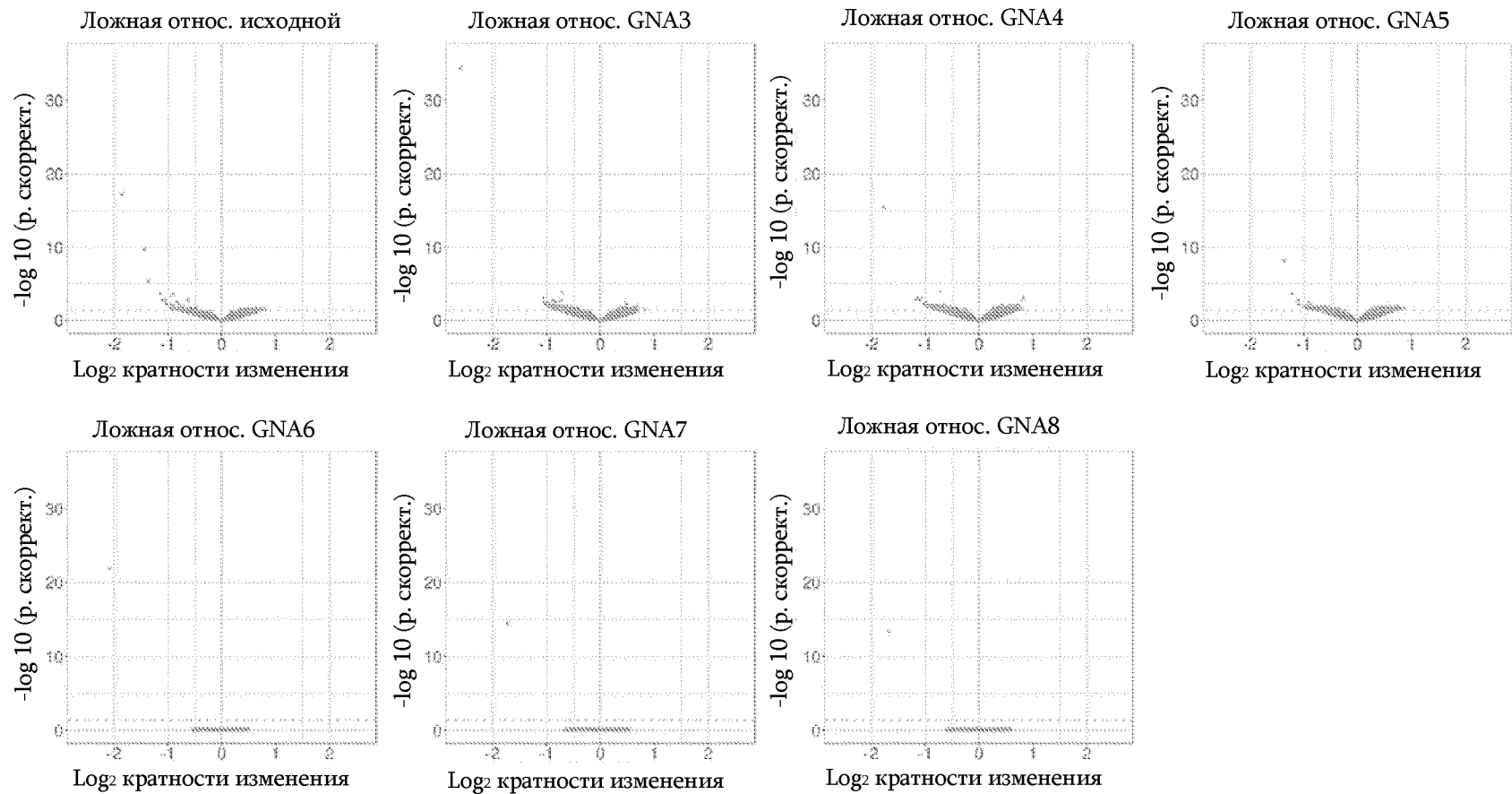
ФИГ. 50



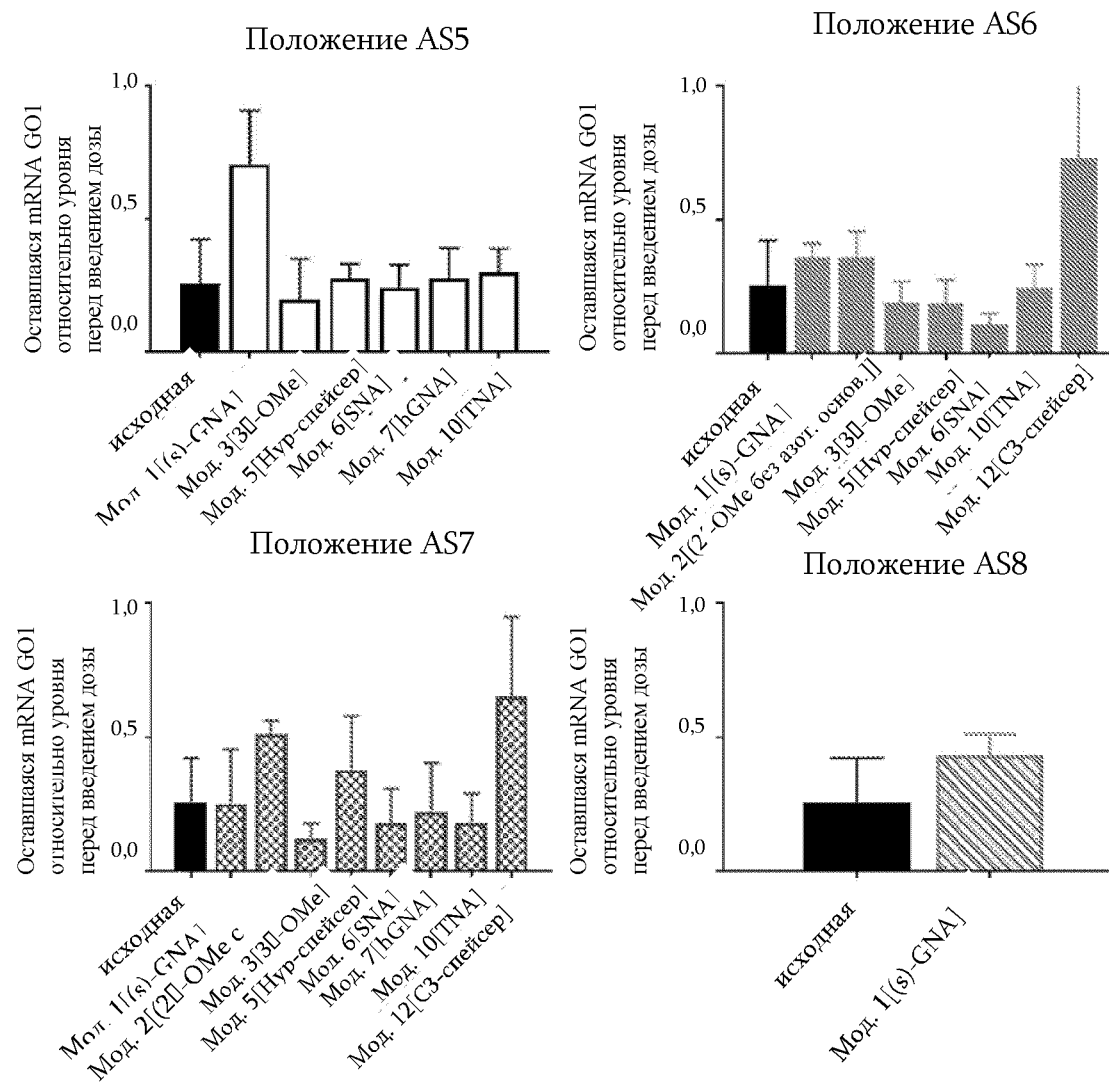
ФИГ. 51



ФИГ. 52



ФИГ. 53



ФИГ. 55