

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091520 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.05

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ lRNA ПРОТИВ БОКСА-1 ВЫСОКОМОБИЛЬНОЙ ГРУППЫ (HMGB1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/599,860

(32) 2017.12.18

(33) US

(86) PCT/US2018/066126

(87) WO 2019/126097 2019.06.27

(71) Заявитель:

ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Хинкл Грегори, Тремблэй Фредерик,
Макайнинч Джеймс Д. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к средствам для RNAi, например к средствам на основе двухнитевой РНК (dsRNA), целенаправленно воздействующим на ген HMGB1. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких средств для RNAi для подавления экспрессии гена HMGB1 и способам предупреждения и лечения связанных с HMGB1 нарушений, например метаболического нарушения или неалкогольной жировой болезни печени, например неалкогольного стеатогепатита (NASH).

A1

202091520

202091520

A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ IRNA ПРОТИВ БОКСА-1 ВЫСОКОМОБИЛЬНОЙ ГРУППЫ (NMGB1) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 62/599860, поданной 18 декабря 2017 года, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 12 декабря 2018 г., имеет название 121301-08020_SL.txt, и ее размер составляет 192137 байт.

Уровень техники

Метаболический синдром является основной причиной смертности и заболеваемости в промышленно развитых странах, и неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) является наиболее распространенным заболеванием печени в развитых странах, которое, по оценкам, поражает каждого третьего взрослого человека в Соединенных Штатах. Ее распространенность среди детей также увеличивается параллельно с детским ожирением.

NAFLD включает весь спектр жировой болезни печени (FLD), поражающей субъектов, которые употребляют мало алкоголя или вовсе не употребляют его. Как следует из названия, основная характеристика неалкогольной жировой болезни печени состоит в очень большом количестве жира, накопленном в клетках печени. Тяжесть NAFLD различна и может варьировать от простого стеатоза печени или неалкогольного ожирения печени (NAFL) до неалкогольного стеатогепатита (NASH), прогрессирующего состояния, которое может приводить к циррозу, гепатоцеллюлярному раку или печеночной недостаточности. NAFLD обычно связана с метаболическим синдромом, комбинацией множества нарушений, включая резистентность к инсулину, абдоминальное ожирение, дислипидемию, повышенное кровяное давление, гиперхолестеринемию и провоспалительное состояние, и считается печеночным проявлением метаболического синдрома. Как и в случае ожирения и резистентности к инсулину, NAFLD была связана с хроническим воспалением. В дополнение к NAFLD, другие повреждающие факторы, включая без ограничения инфекцию печени, печеночное воспаление, цирроз, аутоиммунный гепатит, длительное употребление алкоголя, необязательно в сочетании с одним или более ожирениями печени и повышенным уровнем липидов или холестерина в сыворотке крови; гемохроматоз и длительное применение фармацевтических средств, которые вызывают повреждение печени, были связаны с хроническим воспалением печени и фиброзом печени.

Воспаление печени и фиброз как результат NAFLD, метаболический синдром и

другие повреждающие факторы могут приводить к некрозу печени, который приводит к высвобождению белка бокс-1 высокомолекулярной группы (HMGB1) в виде пассивного высвобождения из гепатоцитов, который, в свою очередь, способствует рекрутированию и активации воспалительных клеток, включая нейтрофилы. HMGB1 также может секретироваться активно посредством неканонического секреторного пути в ответ на клеточный стресс или воспаление. Воспалительный ответ может вызывать дополнительное повреждение клеток и способствовать фиброзу.

Современные способы лечения NAFLD и метаболического синдрома представляют собой прежде всего изменения образа жизни, которые часто неэффективны. Соответственно, в данной области существует потребность в композициях и способах лечения NAFLD и связанных с ней нарушений.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе iRNA, которые воздействуют на РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC)-опосредованного расщепления РНК-транскриптов гена, кодирующего белок бокс-1 высокомолекулярной группы (HMGB1). HMGB1 может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В определенных вариантах осуществления смысловые нити и антисмысловые нити содержат последовательности, выбранные из любой из последовательностей, представленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, перечисленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7.

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухнитевой РНК для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA

содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрены средства на основе двухнитевой РНК для подавления экспрессии HMGB1, которые содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любого из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1019-1039, 1158-1194, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182 или 1174-1194 из SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующего положения в нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2 таким образом, что антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам, отличающимся не более чем 3 нуклеотидами в смысловой нити. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды обеих нитей модифицированы. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В одном аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены средства на основе dsRNA для подавления экспрессии HMGB1, которые содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любого из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1158-1194, 1019-1039, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182 или 1174-1194 в SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующего положения нуклеотидной последовательности в SEQ ID NO:2 таким образом, что антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в смысловой нити.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-

UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512).

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514). В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514).

В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды обеих нитей модифицированы. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. Например, в определенном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами из любой из антисмысловых последовательностей дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-19318, AD-80651 или AD-80652. В определенном варианте осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей любого из вышеуказанных дуплексов.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды смысловой нити модифицированы. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой нити модифицированы. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды как смысловой нити, так и антисмысловой нити модифицированы.

В определенных вариантах осуществления дуплекс содержит модифицированную антисмысловую нить, выбранную из группы антисмысловых последовательностей,

представленных в любой из таблиц 5, 6 или 7. В определенных вариантах осуществления дуплекс содержит модифицированную смысловую нить, выбранную из группы смысловых последовательностей, представленных в любой из таблиц 5, 6 или 7. В определенных вариантах осуществления дуплекс содержит модифицированный дуплекс, выбранный из группы дуплексов, представленных в любой из таблиц 5, 6 или 7. В определенных вариантах осуществления дуплекс выбран из группы, состоящей из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-19318, AD-80651 или AD-80652.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит модифицированную последовательность 5'-usasaguGfgUfUfCfuagcgaguu-3' (SEQ ID NO:525), и антисмысловая нить содержит модифицированную последовательность 5'-asAfscugc(Ggn)cuagaaCfcAfacuuasusu-3' (SQE ID NO:526), где а представляет собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, с представляет собой 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, g представляет собой 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, u представляет собой 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, Af представляет собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, Cf представляет собой 2'-фторцитидин-3'-фосфат, Gf представляет собой 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, Uf представляет собой 2'-фторуридин-3'-фосфат, (Ggn) представляет собой гуанозин-гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA), и s представляет собой фосфотиоатную связь; и где 3'-конец смысловой нити необязательно ковалентно связан с лигандом, например N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипропиолом (также называемым Нур-(GalNAc-алкил)3 или L96).

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит модифицированную последовательность 5'-asasguugGfuUfCfUfagcgaguuu-3' (SEQ ID NO:527), и антисмысловая нить содержит модифицированную последовательность 5'-asAfsacug(Cgn)gcuagaAfcCfaacuuasusu-3' (SQE ID NO:528), где а представляет собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, с представляет собой 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, g представляет собой 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, u представляет собой 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, Af представляет собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, Cf представляет собой 2'-фторцитидин-3'-фосфат, Gf представляет собой 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, Uf представляет собой 2'-фторуридин-3'-фосфат, (Cgn) представляет собой цитидин-гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA), и s представляет собой фосфотиоатную связь; и где 3'-конец смысловой нити необязательно ковалентно связан с лигандом, например, с N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипропиолом (также называемым Нур-(GalNAc-алкил)3 или L96).

В определенных вариантах осуществления длина участка комплементарности между антисмысловой нитью и мишенью составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов. Например, длина участка комплементарности между антисмысловой нитью и мишенью составляет от 19 до 21 нуклеотида, например, длина участка комплементарности составляет

В определенных вариантах осуществления участок комплементарности содержит одну из антисмысловых последовательностей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. В других вариантах осуществления участок комплементарности состоит из одной из антисмысловых последовательностей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить представляет собой антисмысловую нить из дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-

193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-19318, AD-80651 и AD-80652.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2, где практически все нуклеотиды смысловой нити содержат модификацию, выбранную из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию, выбранную из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера на 3'-конце. В определенных вариантах осуществления модификации дополнительно включают GNA-модификацию. В определенных вариантах осуществления GNA-модификация находится в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любых из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1158-1194, 1019-1039, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182 или 1174-1194 из SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из соответствующего положения нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2 таким образом, что антисмысловая нить комплементарна по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в смысловой нити, где практически все нуклеотиды смысловой нити содержат модификацию, выбранную из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию, выбранную из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера на 3'-конце. В определенных вариантах осуществления модификации дополнительно включают GNA-модификацию.

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления каждая нить независимо содержит 19-30 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления каждая нить содержит 14-40 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды смысловой нити модифицированы. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды антисмысловой нити модифицированы. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды как смысловой нити, так и антисмысловой нити модифицированы.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит нарушающий термостабильность нуклеотид, помещенный в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация выбрана из модификации с удалением азотистого основания; ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в дуплексе и дестабилизирующей модификации сахара, такой как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA). В определенных вариантах осуществления дестабилизирующая модификация сахара представляет собой GNA.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка, содержащая средство на основе dsRNA, описанное в данном документе.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, кодирующий по меньшей мере одну нить средства на основе dsRNA, где средство на основе dsRNA содержит участок комплементарности к по меньшей мере части mRNA, кодирующей HMGB1, где длина dsRNA составляет 30 пар оснований или меньше, и где средство на основе dsRNA целенаправленно воздействует на mRNA для расщепления. В определенных вариантах осуществления длина участка комплементарности составляет по меньшей мере 15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина участка комплементарности составляет 19-23 нуклеотида.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция для подавления экспрессии гена HMGB1, содержащая средство на основе dsRNA по настоящему изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению и липидный состав. В определенных вариантах осуществления липидный состав содержит LNP. В определенных вариантах осуществления липидный состав содержит MC3.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ подавления экспрессии HMGB1 в клетке, при этом способ включает (а) приведение клетки в контакт со

средством на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению или фармацевтической композицией по настоящему изобретению; и (b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для достижения разрушения mRNA-транскрипта гена HMGB1, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена HMGB1 в клетке. В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта, например субъекта-человека, например, человека женского пола или человека мужского пола. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия HMGB1 подавляется на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или ниже уровня выявления в клетке. В определенных вариантах осуществления снижение экспрессии HMGB1 выявляют у субъекта с помощью измерения уровня HMGB1 в образце крови или сыворотки крови субъекта. В определенных вариантах осуществления снижение экспрессии HMGB1 выявляют у субъекта с помощью измерения уровня HMGB1 в образце мочи субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления уровень HMGB1 в образце субъекта снижается на по меньшей мере 30%, 40%, предпочтительно на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В определенных вариантах осуществления выявляют белок HMGB1. В определенных вариантах осуществления выявляют РНК HMGB1, например, циркулирующую РНК, присутствующую в везикулярных структурах. В определенных вариантах осуществления РНК HMGB1 анализируют в отношении сайт-специфического расщепления. В определенных вариантах осуществления субъект страдает от связанного с HMGB1 нарушения. В определенных вариантах осуществления субъект соответствует по меньшей мере одному диагностическому критерию метаболического нарушения. В определенных вариантах осуществления у субъекта было диагностировано метаболическое нарушение. В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована NAFLD. В определенных вариантах осуществления у субъекта был диагностирован NASH.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения связанного с HMGB1 нарушения. В определенных вариантах осуществления связанное с HMGB1 нарушение выбрано из воспаления печени, фиброза печени, повреждения печени, связанного с повышенным уровнем HMGB1, метаболического нарушения, показателя кровяного давления, равного или превышающего 130/85 мм рт. ст., большой окружности талии (40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин); соотношения талии и бедер $< 1,0$ (для мужчин) или $< 0,8$ (для женщин); низкого уровня холестерина HDL (до 40 мг/дл для мужчин и до 50 мг/дл для женщин), уровня триглицеридов, составляющего по меньшей мере 150 мг/дл, NAFLD, стеатогепатита, NASH, цирроза при NASH, криптогенного цирроза, гипертензии, гиперхолестеринемии, инфекции печени, печеночного воспаления, цирроза, аутоиммунного гепатита, длительного употребления алкоголя, алкогольного гепатита, алкогольного стеатогепатита, гемохроматоза и длительного применения фармацевтических средств, которые вызывают повреждение печени. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения метаболического нарушения. В одном аспекте в настоящем изобретении

предусмотрен способ лечения NAFLD. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения NASH.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения развития связанного с HMGB1 нарушения у субъекта с риском развития связанного с HMGB1 нарушения. В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения развития NASH у субъекта с риском развития NASH, например, у субъекта с риском развития или диагнозом NAFLD или метаболического нарушения.

В предпочтительных вариантах осуществления субъект с диагнозом или с риском развития связанного с HMGB1 нарушения является человеком. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется по меньшей мере одним признаком метаболического нарушения, выбранным из повышенного уровня глюкозы в крови натощак, составляющего по меньшей мере 100 мг/дл, показателя кровяного давления, равного или превышающего 130/85 мм рт. ст., большой окружности талии, где большая окружность талии составляет 40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин; низкого уровня холестерина HDL, где низкий уровень холестерина LDH составляет до 40 мг/дл для мужчин и до 50 мг/дл для женщин; уровня триглицеридов, равного или выше чем 150 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется уровнем Hb1Ac, составляющим по меньшей мере 6,5%, сахарным диабетом 2 типа или концентрацией глюкозы в крови или сыворотке крови через 2 часа после приема пищи, составляющей по меньшей мере 140 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект страдает ожирением. В определенных вариантах осуществления субъект страдает сахарным диабетом 2 типа. В определенных вариантах осуществления субъект страдает жировой болезнью печени (FLD). В определенных вариантах осуществления субъект страдает NAFLD, например, стеатогепатитом, NASH, циррозом при NASH, криптогенным циррозом или гемохроматозом. В определенных вариантах осуществления субъект страдает воспалением печени или фиброзом. В определенных вариантах осуществления субъект страдает инфекцией печени, циррозом или аутоиммунным гепатитом. В определенных вариантах осуществления у субъекта наблюдается хроническое избыточное употребление алкоголя. В определенных вариантах осуществления субъект страдает алкогольным гепатитом или алкогольным стеатогепатитом. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком женского пола. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком мужского пола.

В определенных вариантах осуществления субъект со связанным с HMGB1 нарушением подвержен риску развития NAFLD. В определенных вариантах осуществления субъект с риском развития NAFLD страдает ожирением. В определенных вариантах осуществления субъект с риском развития NAFLD характеризуется по меньшей мере одним признаком метаболического нарушения, выбранным из повышенного уровня глюкозы в крови натощак, составляющего по меньшей мере 100 мг/дл, показателя кровяного давления, равного или превышающего 130/85 мм рт. ст., большой окружности талии, где большая

окружность талии составляет 40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин; низкого уровня холестерина HDL, где низкий уровень холестерина LDH составляет до 40 мг/дл для мужчин и до 50 мг/дл для женщин; уровня триглицеридов, равного или выше чем 150 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект с риском развития NAFLD характеризуется уровнем Hb1Ac, составляющим по меньшей мере 6,5%, сахарным диабетом 2 типа или концентрацией глюкозы в крови или сыворотке крови через 2 часа после приема пищи, составляющей по меньшей мере 140 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект с риском развития NAFLD характеризуется состоянием с установленной связью с NAFLD, таким как ожирение, сахарный диабет 2 типа, дислипидемия и болезнь поликистозных яичников. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется связанным с NAFLD состоянием, таким как гипотиреоз, синдром обструктивного апноэ во сне, гипопитуитаризм, гипогонадизм, панкреатодуоденальная резекция и псориаз. В определенных вариантах осуществления субъект страдает NAFLD. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком женского пола. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком мужского пола.

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают наблюдение субъекта в отношении изменений в одном или более диагностических маркерах связанного с HMGB1 нарушения, например, NAFLD или метаболического нарушения. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение уровня HMGB1 у субъекта, например, уровня белка HMGB1 или РНК в образце крови или сыворотки крови субъекта или в образце мочи субъекта. В определенных вариантах осуществления субъект был подвергнут тесту в отношении уровня HbA1c, уровня глюкозы в крови до приема пищи, уровня глюкозы в крови после приема пищи, чувствительности к инсулину или тест в отношении чувствительности к глюкозе, тест в отношении кровяного давления, тест в отношении уровня холестерина или тест в отношении уровня липидов в сыворотке крови; или определение веса и роста или определение окружности талии.

В определенных вариантах осуществления субъекту было введено дополнительное средство или субъекта подвергали вмешательству для лечения метаболического нарушения, например, дополнительное средство для лечения повышенного кровяного давления, или диабета 2 типа, или операции по шунтированию желудка.

В различных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В определенных вариантах осуществления средство

на основе dsRNA вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят приблизительно один раз в месяц, приблизительно один раз каждые два месяца, приблизительно один раз в квартал (т. е. один раз каждые три месяца) или приблизительно один раз каждые шесть месяцев в дозе, составляющей от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят не более чем приблизительно один раз в месяц.

В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту один раз в месяц. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту один раз каждые три месяца. В определенных вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят один раз каждые три-шесть месяцев. В определенных вариантах осуществления средство на основе РНК вводят не более чем один раз в месяц.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

В определенных вариантах осуществления измеряют уровень HMGB1 у субъекта. В определенных вариантах осуществления уровень HMGB1 представляет собой уровень белка HMGB1 в образце крови или сыворотки крови субъекта или уровень РНК HMGB1 в образце крови или мочи. В определенных вариантах осуществления РНК в образце крови или мочи анализируют в отношении сайта расщепления siRNA.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе iRNA, которые воздействуют на РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC)-опосредованного расщепления РНК-транскриптов гена HMGB1. Ген может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. Применение этих iRNA обеспечивает возможность целенаправленного разрушения mRNA соответствующего гена (гена HMGB1) у млекопитающих.

iRNA по настоящему изобретению были сконструированы для нацеливания на ген HMGB1 человека, в том числе части гена, которые консервативны среди ортологов HMGB1 других видов млекопитающих. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и конкретных целевых сайтов или конкретных модификаций в этих iRNA придает iRNA по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения и предупреждения связанного с HMGB1 нарушения, например, NAFLD или метаболического нарушения с применением композиции на основе iRNA, которая воздействует на РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC)-опосредованного расщепления РНК-транскриптов гена HMGB1.

iRNA по настоящему изобретению содержат нить РНК (антисмысловую нить), имеющую участок, длина которого составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, предпочтительно 19-21 нуклеотид, причем этот участок практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена HMGB1.

В определенных вариантах осуществления длина одной или обеих нитей двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению составляет не более 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком из по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, который практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена HMGB1. В некоторых вариантах осуществления такие средства на основе iRNA, имеющие антисмысловые нити большей длины, предпочтительно могут содержать вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина одной или обеих нитей двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению составляет не более 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, с участком из по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, который практически комплементарен по меньшей мере части mRNA-транскрипта гена HMGB1. В некоторых вариантах осуществления такие средства на основе iRNA, имеющие антисмысловые нити большей длины, могут содержать вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение iRNA по настоящему изобретению обеспечивает возможность целенаправленного разрушения mRNA соответствующего гена (гена HMGB1) у млекопитающих. С помощью анализов *in vitro* и *in vivo* авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что iRNA, целенаправленно воздействующие на ген HMGB1, способны опосредовать RNAi, что приводит к значительному подавлению экспрессии HMGB1. Таким образом, способы и композиции, содержащие эти iRNA, применимы для предупреждения и лечения субъекта с риском развития или диагнозом связанного с HMGB1 нарушения, например, NAFLD или метаболического нарушения. Способы и композиции в данном документе применимы для снижения уровня HMGB1 у субъекта, в особенности у субъекта, страдающего от связанного с HMGB1 нарушения.

В следующем подробном описании раскрыто, как создавать и применять композиции, содержащие iRNA для подавления экспрессии гена HMGB1, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов, которые получили бы пользу от снижения экспрессии гена HMGB1, например, субъектов с риском развития или диагнозом связанного с HMGB1 нарушения, например, NAFLD или метаболического

нарушения.

I. Определения

Чтобы можно было легче понимать настоящее изобретение, вначале приводятся определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях изложения значения или диапазона значений параметра подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к изложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одной или более (т. е. по меньшей мере одного) грамматических форм предмета заявки. В качестве примера "элемент" означает один элемент или более элементов, например, множество элементов.

Термин "включающий" используют в данном документе для обозначения фразы "включающий без ограничения" и используют взаимозаменяемо с ней.

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или", если из контекста явно не следует иное, и используют взаимозаменяемо с ним. Например, под выражением "смысловая нить или антисмысловая нить" понимают выражение "смысловая нить или антисмысловая нить или смысловая нить и антисмысловая нить".

Термин "приблизительно" используют в данном документе для обозначения нахождения в пределах типичных диапазонов отклонений, допустимых в данной области техники. Например, "приблизительно" можно понимать как нахождение в пределах приблизительно 2 стандартных отклонений от среднего. В определенных вариантах осуществления приблизительно означает +10%. В определенных вариантах осуществления приблизительно означает +5%. В случае если "приблизительно" находится перед группой числовых значений или диапазоном, следует понимать, что "приблизительно" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Термин "по меньшей мере" перед числовым значением или группой числовых значений понимают как включающий числовое значение, находящееся рядом с термином "по меньшей мере", и все последующие числовые значения или целые числа, которые могут быть по логике включены, что ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, "по меньшей мере 18 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотида" означает, что указанным свойством обладают 18, 19, 20 или 21 нуклеотидов. В случае если "по меньшей мере" находится перед группой числовых значений или диапазоном, следует понимать, что "по меньшей мере" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Используемые в данном документе фразы "не более чем" или "менее чем" понимают как значение, смежное с фразой, и последовательные более низкие значения или целые числа, как логически следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с выступающим концом, состоящим из "не более чем 2 нуклеотидов", имеет выступающий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. В случае если выражение "не более чем" находится перед группой числовых

значений или диапазоном, понятно, что выражение "не более чем" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Используемые в данном документе диапазоны включают как верхний, так и нижний пределы.

В случае конфликта между последовательностью и ее указанным сайтом в транскрипте или другой последовательностью, нуклеотидная последовательность, указанная в описании, например, в таблицах, в которых предусмотрены дуплексные последовательности, имеет приоритет.

Используемый в данном документе термин "белок бокс-1 высокомобильной группы" или "HMGB1" означает белок, который принадлежит к суперсемейству белков бокс высокомобильной группы. Кодированный негистоновый белок, связывающий ядерную ДНК, регулирует транскрипцию и участвует в изменении структуры ДНК. Этот белок играет роль в нескольких клеточных процессах, включая воспаление, дифференцировку клеток и миграцию опухолевых клеток. Было идентифицировано множество псевдогенов этого гена. Альтернативный сплайсинг приводит к возникновению множества вариантов транскрипта, которые кодируют один и тот же белок. Дополнительная информация о HMGB1 предусмотрена, например, в базе данных генов NCBI по ссылке www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3146 (которая включена в данный документ посредством ссылки в версии, доступной по состоянию на 18 декабря 2017 года). HMGB1 также известен как HMG1; HMG3; HMG-1; SBP-1. Если иное не ясно из контекста, то HMGB1 или его варианты или капитализация могут относиться к любому гену, РНК и белку, включая процессированные и неprocessированные формы или фрагменты белка или РНК.

Используемый в данном документе термин "HMGB1" относится ко встречающемуся в природе гену, который кодирует белок HMGB1. Аминокислотную и полную кодирующую последовательности эталонной последовательности гена HMGB1 человека можно найти, например, в GenBank под номером доступа NM_002128.5 (SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2). Ортологи млекопитающих гена HMGB1 человека можно найти, например, под номером доступа NM_010439.4 мыши (SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:4); под номером доступа NM_012963.2 крысы (SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6) и под номером доступа NM_001283356.1 яванского макака (SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8). Варианты транскрипта HMGB1 человека включают в себя NM_001313892.1 (SEQ ID NO: 9 и 10) и NM_001313893.1 (SEQ ID NO: 11 и 12).

Ряд встречающихся в природе SNP известен, и его можно найти, например, в базе данных SNP в NCBI по ссылке www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?LinkName=gene_snp&from_uid=3146 (которая включена в данный документ посредством ссылки в версии, доступной по состоянию на 18 декабря 2017 года), в которой перечислены SNP в HMGB1 человека. В предпочтительных вариантах осуществления такие встречающиеся в природе варианты включены в объем понятия "последовательность гена HMGB1".

Используемое в данном документе выражение "связанное с HMGB1 нарушение" и

т. п. понимается как заболевание или состояние, связанное со стеатозом печени, воспалением, фиброзом или повреждением, связанным с повышенным уровнем HMGB1 или высвобождением HMGB1 из клеток печени из-за гибели клеток (например, некроза или апоптоза) или активной секреции. Иллюстративные связанные с HMGB1 нарушения включают метаболическое нарушение и его диагностические компоненты, NAFLD (например, стеатогепатит, NASH, цирроз при NASH или криптогенный цирроз), ожирение, инфекцию печени, печеночное воспаление, цирроз, аутоиммунный гепатит, длительное употребление алкоголя, необязательно в связи с одним или более из ожирения печени и повышенного уровня липидов или холестерина в сыворотке крови; алкогольный гепатит, алкогольный стеатогепатит, гемохроматоз и длительное применение фармацевтических средств, которые вызывают повреждение печени. В определенных вариантах осуществления связанные с HMGB1 нарушения представляют собой нарушения, связанные с хроническими повреждающими факторами. В определенных вариантах осуществления связанные с HMGB1 нарушения исключают нарушения, связанные с острыми повреждающими факторами, например, острым токсическим поражением печени вследствие отравления, например, острой передозировки ацетаминофена.

Используемый в данном документе термин "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной во время транскрипции гена HMGB1, включая mRNA, которая представляет собой продукт РНК-процессинга первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет иметь длину, достаточную по меньшей мере для того, чтобы служить в качестве субстрата для iRNA-направленного расщепления в этой части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной во время транскрипции гена HMGB1, или рядом с ней. В одном варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах кодирующего белок участка HMGB1.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять от приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Также предусматривается, что диапазоны и длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и длин, являются частью настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" обозначает олигонуклеотид, содержащий цепь из нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, обозначает нуклеотид, который в качестве основания содержит гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил, соответственно.

Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, более подробно описанный ниже, или имитирующий заменяющий фрагмент (см., например, таблицу 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами практически без изменения свойств образования пар оснований у олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены на гуанин и урацил соответственно для образования неоднозначных пар оснований G-U с целевой mRNA. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA направляет специфическое в отношении последовательности разрушение mRNA посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например подавляет, экспрессию гена HMGB1 в клетке, например, в клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью mRNA HMGB1, направляя расщепление целевой РНК. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на siRNA под действием эндонуклеазы III типа, известной под названием Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что дает возможность комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой mRNA одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень с индукцией сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой РНК (siRNA), образованной внутри клетки и способствующей образованию комплекса

RISC для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена HMGB1. Соответственно, термин "siRNA" также используется в данном документе для обозначения вышеописанной iRNA.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi может представлять собой одонитевую siRNA (ssRNAi), которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой mRNA. Одонитевые средства для RNAi связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую mRNA. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно применять в качестве одонитевой siRNA, как описано в данном документе, или в качестве химически модифицированной с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В определенных вариантах осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК и упоминается в данном документе как "средство на основе двухнитевой РНК", "молекула двухнитевой РНК (dsRNA)", "средство на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, содержащему две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т. е. гену HMGB1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например mRNA, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, называемого в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или более нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемая в данном описании "iRNA" может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями; iRNA может содержать значительные модификации нескольких нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь, или модифицированное нуклеиновое основание, или любую их комбинацию. Таким образом, термин "модифицированный нуклеотид" охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по

настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, как применяемые в молекуле типа siRNA, охватываются терминами "iRNA" или "средство для RNAi" для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая дает возможность осуществлять специфическое разрушение требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, и его длина может варьировать в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, его длина может составлять приблизительно 15-30 пар оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как например, приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Также предусматривается, что диапазоны и длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и длин, являются частью настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. В тех случаях, когда две нити являются частью одной более крупной молекулы, а следовательно соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительная цепь РНК называется петлей типа "шпилька". Петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или больше неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 10 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 8 или менее неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 4-8 нуклеотидов.

Если две практически комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, то эти молекулы не должны, но могут быть соединены ковалентно. Если две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительная структура обозначается как "линкер". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для RNAi может содержать один или более нуклеотидных

выступающих концов.

В определенных вариантах осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению представляет собой dsRNA, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например гена HMGB1, направляя расщепление целевой РНК.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью mRNA HMGB1, направляя расщепление целевой РНК.

Используемый в данном документе термин "выступающий конец" означает по меньшей мере один неспаренный нуклеотид, который выступает из дуплексной структуры двухнитевой iRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец из по меньшей мере одного нуклеотида. В качестве альтернативы, выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступающий(-е) конец(-цы) может(-гут) находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(-ы) выступающего конца может(-гут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах как антисмысловой, так и смысловой нити dsRNA.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит нуклеотидный выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов на 3'-конце или 5'-конце. В определенных вариантах осуществления выступающий конец на смысловой нити или антисмысловой нити, или обеих, может содержать удлиненные отрезки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или более нуклеотидов удлиненного выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так

что выступающий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означает, что на конце средства на основе двухнитевой РНК нет неспаренных нуклеотидов, т. е. нет нуклеотидного выступающего конца. Средство на основе двухнитевой РНК "с тупыми концами" является двухнитевым на протяжении всей своей длины, т. е. не имеет нуклеотидного выступающего конца на любом конце молекулы. Средства для RNAi по настоящему изобретению включают средства для RNAi без нуклеотидного выступающего конца на одном конце (т. е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или без нуклеотидных выступающих концов на любом конце. Чаще всего такая молекула будет двухнитевой на протяжении всей своей длины.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например dsRNA, которая содержит участок, который практически комплементарен целевой последовательности, например mRNA HMGB1. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку антисмысловой нити, который практически комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности HMGB1, определенной в данном документе. Если участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, во внутренних или концевых участках молекулы могут находиться ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4 или 3 нуклеотидов 5'- или 3'-конца iRNA. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению включает ошибку спаривания нуклеотидов в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению включает ошибку спаривания нуклеотидов в смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца iRNA. В другом варианте осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде iRNA.

Используемый в данном документе термин "смысловая нить" или "сопровождающая нить" относится к нити iRNA, которая содержит участок, который практически комплементарен участку антисмысловой нити, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе.

Используемая в данном документе фраза "практически все нуклеотиды являются модифицированными" означает, что практически все нуклеотиды в значительной степени, но не полностью модифицированы, и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" обозначает участок, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт в мишени, в котором происходит расщепление. В некоторых

вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, связываемом нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, а участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Используемый в данном документе термин "комплементарный", если не указано иное, при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности обозначает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, что будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, при этом жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей отмывкой (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые могут встречаться в организме. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах iRNA, например, в пределах dsRNA, как описано в данном документе, предусматривают образование пар оснований между олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими первую полинуклеотидную последовательность, и олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут обозначаться как "полностью комплементарные" по отношению друг к другу. Тем не менее, если в данном документе первую последовательность обозначают как "практически комплементарную" по отношению ко второй последовательности в данном документе, то две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может происходить ошибочное спаривание одной или более, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса размером не более 30 пар оснований, при этом сохраняется способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, подавлению экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако, если два олигонуклеотида разработаны так, чтобы после гибридизации образовывался один или более односторонних выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться ошибками спаривания применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один

олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом обозначаться как "полностью комплементарная" для целей, описанных в данном документе.

Используемые в данном документе "комплементарные" последовательности могут также содержать пары оснований или могут быть полностью образованы из таких пар, которые образованы не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из не встречающихся в природе и модифицированных нуклеотидов, в той мере, в которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности к гибридизации. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначные G:U или Хугстиновские пары оснований.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "практически комплементарный" в данном документе можно применять по отношению к соответствию оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью средства на основе двухнитевой РНК и целевой последовательностью, что будет понятно из контекста их применения.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "практически комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (mRNA), относится к полинуклеотиду, который практически комплементарен непрерывной части представляющей интерес mRNA (например, mRNA, кодирующей ген HMGB1). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA HMGB1, если последовательность практически комплементарна непрерывной части mRNA, кодирующей ген HMGB1.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды смысловой нити, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности HMGB1. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности HMGB1. В других вариантах осуществления полинуклеотиды смысловой нити или антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны последовательности, обратной комплементарной целевой последовательности HMGB1, и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2 или фрагменту SEQ ID NO:2, например, комплементарна на по меньшей мере 85%, 90% или 95% или комплементарна на 100%. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности HMGB1 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или фрагменту SEQ ID NO:1, например, комплементарна на по меньшей мере 85%, 90% или 95% или

комплементарна на 100%. Целевые сайты можно определять посредством идентификации целевого сайта на целевой последовательности HMGB1, например SEQ ID NO: 1. Соответствующая часть SEQ ID NO: 2, обратная комплементарная последовательности SEQ ID NO: 1, представляет собой часть SEQ ID NO: 2, которая будет комплементарна части SEQ ID NO: 1 на протяжении длины, достаточной для получения двухнитевого средства для RNAi, раскрытого в данном документе.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности HMGB1. В других вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, практически комплементарны целевой последовательности HMGB1 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1 или фрагменту SEQ ID NO:1, например, комплементарна на приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. В определенных вариантах осуществления фрагмент SEQ ID NO: 1 выбран из группы нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1019-1039, 1158-1194, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182, или 1174-1194 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению включает антисмысловую нить, которая практически комплементарна целевой последовательности HMGB1 и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из смысловых нитей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7 или фрагменту любой из смысловых нитей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, например, комплементарна на приблизительно 85%, 90%, 95% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению включает смысловую нить, которая практически комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности HMGB1, и при этом полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из антисмысловых нитей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7 или фрагменту любой из антисмысловых нитей в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, например, на приблизительно 85%, 90%, 95% или 100%.

В определенных вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7 выбраны из дуплексов. AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-

193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-193181, AD-80651 или AD-80652.

Как правило, "iRNA" содержит рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, как применяемые в молекуле siRNA, охватываются термином "RNAi" для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой молекулу одонитевого антисмыслового олигонуклеотида, которая ингибирует целевую mRNA посредством механизма антисмыслового подавления. Молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида комплементарна последовательности в пределах целевой mRNA. Одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды могут подавлять трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с mRNA и физического воспрепятствования механизму трансляции, см. Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Длина молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может составлять от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов и иметь последовательность, которая комплементарна целевой последовательности. Например, молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

Фраза "приведение клетки в контакт с iRNA", такой как dsRNA, используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с iRNA включает приведение клетки в контакт с iRNA *in vitro* или приведение клетки в контакт с iRNA *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, RNAi может приводиться в физический контакт с клеткой индивидуумом, осуществляющим способ, или, в качестве альтернативы, iRNA можно поместить в обстановку, которая даст возможность средству впоследствии прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно осуществлять, например, с помощью инкубирования клетки с iRNA. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно осуществлять, например, с помощью инъекции iRNA в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней, или с помощью инъекции iRNA в другую область, например в кровоток или подкожное пространство таким образом, что средство будет впоследствии достигать ткани, где находится клетка, которую необходимо привести в контакт. Например, iRNA может содержать или быть связана с лигандом, например GalNAc, который направляет iRNA к представляющему интерес месту, например печени. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку можно также приводить в контакт с iRNA *in vitro* и впоследствии пересаживать субъекту.

В определенных вариантах осуществления приведение клетки в контакт с iRNA включает "введение" или "доставку iRNA в клетку" посредством содействия поглощению или абсорбции в клетку или их осуществления. Абсорбция или поглощение iRNA могут происходить посредством самостоятельной диффузии или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение iRNA в клетку можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения iRNA *in vivo* можно вводить в участок ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже или известны из уровня техники.

Термин "липидная наночастица" или "LNP" означает везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, iRNA или плазида, с которой транскрибируется iRNA. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), отличное от примата млекопитающее (такое как корова, свинья, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса или мышь) или птицу, которая экспрессирует целевой ген либо эндогенно, либо гетерологично. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой животное с диагнозом или риском развития нарушения, связанного с HMGB1. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой животное с диагнозом NASH или риском развития NASH, например, субъекта с риском развития или диагнозом NAFLD или метаболическим нарушением. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта, соответствующего по меньшей мере одному диагностическому критерию метаболического нарушения, например, такому как кровяное давление, равное или превышающее 130/85 мм рт. ст., большая окружность талии (40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин); соотношение талии и бедер $< 1,0$ (для мужчин) или $< 0,8$ (для женщин); низкий уровень холестерина HDL (до 40 мг/дл для мужчин и до 50 мг/дл для женщин) или уровень триглицеридов, составляющий по меньшей мере 150 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект характеризуется одним или более из уровня Hb1Ac, составляющего по меньшей мере 6,5%, сахарного диабета 2 типа, повышенного уровня глюкозы в крови натощак, составляющего по меньшей мере 100 мг/дл, концентрации глюкозы в крови или сыворотке крови через 2 часа после приема пищи, составляющей по меньшей мере 140 мг/дл. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта, соответствующего по меньшей мере одному диагностическому критерию NAFLD, например, такому как NAFL, стеатогепатит, NASH, цирроз при NASH или криптогенный цирроз. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта, соответствующего по

меньшей мере одному диагностическому критерию NASH. В определенных вариантах осуществления у субъекта было диагностировано по меньшей мере одно из печеночного воспаления, цирроза, аутоиммунного гепатита, хронического употребления алкоголя, необязательно в связи с одним или более из ожирения печени и повышенного уровня липидов или холестерина в сыворотке крови; гемохроматоза, или субъект длительно применяет или применял фармацевтические средства, которые вызывают повреждение печени. Диагностические критерии метаболического нарушения и NAFLD, например NASH, предусмотрены ниже. В определенных вариантах осуществления у субъекта с риском развития NASH было диагностировано одно из гипотиреоза, синдрома обструктивного апноэ во сне, гипопитуитаризма, гипогонадизма, панкреатодуоденальной резекции и псориаза. Известно, что диагностические критерии метаболического синдрома и различных NAFLD совпадают. В определенных вариантах осуществления субъект соответствует полным диагностическим критериям метаболического нарушения или NAFLD, например NASH. В определенных вариантах осуществления субъект имеет связанное с HMGB1 нарушение, связанное с хроническим повреждающим фактором. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком женского пола. В других вариантах осуществления субъект является человеком мужского пола.

Применяемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к полезному или требуемому результату, такому как снижение проявления по меньшей мере одного признака или симптома связанного с HMGB1 нарушения, например, метаболического нарушения или NAFLD, например NASH, у субъекта. "Лечение" также может означать увеличение срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни в отсутствие лечения.

Термин "более низкий" в контексте уровня экспрессии гена HMGB1 или образования белка HMGB1 у субъекта или маркера заболевания или симптома относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может быть, например, на по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня выявления для способа выявления в соответствующей клетке или ткани, например, в клетке печени или другого образца от субъекта, например, в моче, крови или сыворотки крови, полученных от него. Снижение не требует системной оценки уровня белка или РНК. Снижение может быть ограничено тканью, например печенью.

Как используется в данном документе, "предупреждение" или "осуществление предупреждения" при применении в отношении заболевания, нарушения или состояния у субъекта, который получил бы пользу от снижения экспрессии гена HMGB1 или образования белка HMGB1, например, субъекта с риском развития связанного с HMGB1 нарушения, например, метаболического нарушения, NAFLD или NASH. В определенных вариантах осуществления у субъекта с риском развития NASH была диагностирована NAFLD, гипотиреоз, синдром обструктивного апноэ во сне, гипопитуитаризм, гипогонадизм, панкреатодуоденальная резекция или псориаз. Неспособность к развитию метаболического нарушения или NAFLD, например NASH, или к прогрессированию до

более тяжелой NAFLD, например, от NAFL до NASH, в течение месяцев или лет считается эффективным предупреждением. Для предупреждения может потребоваться введение более чем одной дозы средства на основе iRNA.

"Терапевтически-эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый требуемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, предусмотренном для любого лечения. Применяемую в способах по настоящему изобретению iRNA можно вводить в достаточном количестве для получения приемлемого соотношения польза/риск, предусмотренного для такого лечения.

Фраза "фармацевтически приемлемый" применяется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемая в данном документе фраза "фармацевтически-приемлемый носитель" означает фармацевтически-приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, добавку для производства (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 до другого органа или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред субъекту, подлежащему лечению. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения с помощью инъекции. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения с помощью ингаляции. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) виды крахмала, 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 или полиангидриды; (22) объемобразующие

средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Используемый в данном документе термин "образец" включает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы ткани могут включать образцы из тканей, органов или ограниченных участков. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток этих органов. В определенных вариантах осуществления образцы можно быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта", относится к моче, полученной от субъекта. "Образец, полученный от субъекта", может относиться к моче, крови или сыворотке крови или плазме крови, полученной из крови субъекта.

I. iRNA по настоящему изобретению

В настоящем изобретении предусмотрены iRNA, которые подавляют экспрессию гена HMGB1. В предпочтительных вариантах осуществления iRNA включает молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии гена HMGB1 в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человек с риском развития связанного с HMGB1 нарушения, например, метаболического нарушения, NAFLD или NASH. Средство для dsRNAi включает в себя антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части mRNA, образованной при экспрессии гена HMGB1. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длина составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген HMGB1, iRNA подавляет экспрессию гена HMGB1 (например, гена HMGB1 человека, примата, отличного от примата млекопитающего или птицы) на по меньшей мере приблизительно 30%, предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 50%, как проанализировано с помощью, например, ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA) или с помощью способа на основе анализа белков, такого как иммунофлуоресцентный анализ с применением, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В предпочтительных вариантах осуществления подавление экспрессии определяют с помощью способа qPCR, предусмотренного в примерах, в частности в примере 2 с siRNA при концентрации 10 нМ с использованием предусмотренной в нем линии клеток подходящего организма. В определенных вариантах осуществления подавление экспрессии *in vivo* определяют посредством нокдауна гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, мыши или инфицированной с помощью AAV мыши,

экспрессирующей целевой ген человека, например, при введении однократной дозы при 3 мг/кг при максимальном снижении экспрессии РНК. В определенных вариантах осуществления подавление экспрессии определяют с использованием подходящей модели заболевания, в которой экспрессия целевого гена повышается в ответ на симптом заболевания, например, мышцы в случае введения однократной дозы при 3 мг/кг при максимальном снижении экспрессии РНК. Экспрессию РНК в печени определяют с применением способов на основе ПЦР, предусмотренных в примере 2. В определенных вариантах осуществления экспрессию РНК определяют с использованием образца печени. В определенных вариантах осуществления экспрессию РНК определяют в связанной с везикулами РНК из образца крови или мочи с применением способов, известных из уровня техники, как предусмотрено, например, в Sehgal et al., RNA 20:143-149, 2014; Chan et al., Mol. Ther. Nucl. Acids. 4:e263, 2015.

dsRNA включает в себя две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который практически комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получать из последовательности mRNA, образованной во время экспрессии гена HMGB1. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити, за счет этого две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно из уровня техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. В определенных вариантах осуществления длина дуплекса составляет 19-21 пару оснований. Также предусматривается, что диапазоны и длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и длин, являются частью настоящего изобретения.

Подобным образом, длина участка комплементарности по отношению к целевой последовательности составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления длина участка комплементарности

составляет 19-21 нуклеотид. Также предусматривается, что диапазоны и длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и длин, являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления длина dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 23 нуклеотида, или длина составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно из уровня техники, dsRNA, длина которых составляет более чем приблизительно 21-23 нуклеотида, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Специалисту в данной области также будет понятно, что участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы mRNA. В соответствующих случаях "частью" mRNA-мишени является непрерывная последовательность mRNA-мишени, имеющая длину, достаточную для того, чтобы дать ей возможность быть субстратом для RNAi-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути с участием RISC).

Специалисту в данной области техники также будет понятно, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, дуплексный участок из от приблизительно 9 до приблизительно 36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, в тех случаях, когда она процессируется до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который целенаправленно воздействует на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, применимое для целенаправленного воздействия на экспрессию гена HMGB1, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или более односторонних нуклеотидных выступающих концов, например, из 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут характеризоваться неожиданно более высокими подавляющими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами.

Нуклеотидный выступающий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступающий(-е) конец(-цы) может(-гут) находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(-ы) выступающего конца может(-гут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных из уровня техники и дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, такого как, например, коммерчески доступный от Biosearch, Applied BiosystemsTM, Inc.

Двухнитевые соединения для RNAi по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Вначале отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают по отдельности. Затем составляющие нити гибридизируют. Отдельные нити соединения на основе siRNA можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Преимущество органического синтеза в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Подобным образом, одонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению включает в себя по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, предусмотренных в таблицах 3 и 5, и соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей из любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. В данном аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей практически комплементарна последовательности mRNA, образующейся при экспрессии гена HMGB1. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет включать в себя два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, и второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. В определенных вариантах осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В других вариантах осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде. В определенных вариантах осуществления смысловая или антисмысловая нить из любой из таблиц 3, 5, 6 или 7 выбрана из смысловой или антисмысловой нити из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-193181, AD-80651 или AD-80652.

Будет понятно, что хотя последовательности в таблице 3 не описаны как

модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, представленных в таблице 3, или последовательностей из любой из таблиц 5, 6 или 7, которые являются модифицированными, или последовательностей из любой из таблиц 5, 6 или 7, которые являются конъюгированными. Другими словами, настоящее изобретение охватывает dsRNA из любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, которая является немодифицированной, неконъюгированной, модифицированной или конъюгированной, как описано в данном документе.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA, имеющие дуплексную структуру из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были признаны особенно эффективными для индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, представленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, описанные в данном документе dsRNA могут содержать по меньшей мере одну нить, длина которой составляет как минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предположить, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей из любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть эффективными, аналогично вышеописанным dsRNA. Следовательно, dsRNA, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей из любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, и отличающиеся по своей способности подавлять экспрессию гена HMGB1 не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, предусмотренные в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, идентифицируют сайт(-ы) в транскрипте HMGB1, который(-е) является(-ются) восприимчивым(-и) к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые нацелены на один из этих сайтов. Как используется в данном документе, говорится, что iRNA нацелена на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене HMGB1.

iRNA, как описано в данном документе, может содержать одну или более ошибок

спаривания с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область с ошибкой спаривания не находилась в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, то предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов либо от 5'-, либо от 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, которая комплементарна участку гена HMGB1, обычно не содержит какой-либо ошибки спаривания в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные из уровня техники, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибку спаривания с целевой последовательностью, эффективной в подавлении экспрессии гена HMGB1. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания в подавлении экспрессии гена HMGB1 является важным, особенно если известно, что конкретный участок комплементарности в гене HMGB1 характеризуется полиморфной изменчивостью последовательности внутри популяции.

II. Модифицированные iRNA по настоящему изобретению

В определенных вариантах осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации или конъюгации, известные из уровня техники и описанные в данном документе. В других вариантах осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной с целью повышения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все из нуклеотидов iRNA или практически все нуклеотиды iRNA являются модифицированными, т. е. в нити iRNA присутствует не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы или модифицированы способами, хорошо известными из уровня техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т. д.); модификации оснований, например, замену на стабилизирующие основания, дестабилизирующие основания или основания, которые образуют пару оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгацию оснований;

модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений на основе iRNA, применимых в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не встречающиеся в природе межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остова. Для целей данного описания и как иногда упоминается в уровне техники модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остова, также могут считаться олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остова.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их аналоги с 2'-5'-связями, а также таковые с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных структурных единиц соединены в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе dsRNA по настоящему изобретению представлены в форме свободной кислоты. В других вариантах осуществления настоящего изобретения средства на основе dsRNA по настоящему изобретению представлены в форме соли. В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению представлены в форме натриевой соли. В определенных вариантах осуществления, если средства на основе dsRNA по настоящему изобретению представлены в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в средстве в виде противоионов для практически всех фосфодиэфирных или фосфотиоатных групп, присутствующих в средстве. Средства, в которых практически все из фосфодиэфирных или фосфотиоатных связей имеют натриевый противоион, содержат не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной или фосфотиоатной связей без натриевого противоиона. В некоторых вариантах осуществления, если средства на основе dsRNA по настоящему изобретению представлены в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в средстве в виде противоионов для всех фосфодиэфирных или фосфотиоатных групп, присутствующих в средстве.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050;

6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6, 239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437 и 5,677,439, , полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Подходящие РНК-миметики рассматриваются для применения в iRNA, предусмотренных в данном документе, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохранены для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, в котором РНК-миметик, который, как было показано, обладает превосходными гибридизационными свойствами, обозначен как пептидная нуклеиновая кислота (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен на амидсодержащий остов, в частности аминоксилотный остов. Нуклеиновые основания оставлены, и они связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азогруппы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении,

включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метилен(метиимино) или ММI-остов], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [где нативный сложный фосфодиэфирный остов представлен как $--O--P--O--CH_2--$] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова из вышеупомянутого патента США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать в 2'-положении одно из следующего: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀алкил или C₂-C₁₀алкенил и алкинил. Иллюстративные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат в 2'-положении одно из следующего: низший C₁-C₁₀алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2'-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F-модифицированные нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-модифицированные нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение таких модифицированных сахарных структур, включают без

ограничения патенты США №№ 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633 и 5,700,920, некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

iRNA также может содержать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто "основанием"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают такие, которые раскрыты в патенте США № 3687808, такие как те, что раскрыты в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; такие как те, что раскрыты в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, такие как те, что раскрыты в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и такие как те, что раскрыты в *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), и они представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-О-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают без ограничения вышеуказанные

патенты США №№ 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672 и 7,495,088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, что включает одну или более запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

В некоторых вариантах осуществления РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, что включает один или более бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное путем формирования мостика между двумя атомами. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид, имеющий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, вследствие чего образуется бициклическая кольцевая система. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может содержать одну или более запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами кольца рибозила. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению содержат один или более бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2'

(ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненным этилом" или "cEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12-алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134) и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации патентов США, в которых изложено получение нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие: патенты США №№ 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов можно получать с одной или более стереохимическими конфигурациями сахаров, в том числе, например, α-L-рибофуранозой и β-D-рибофуранозой (см. WO 99/14226).

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или более затрудненных этилом нуклеотидов. Как используется в данном документе, "затрудненный этилом нуклеотид" или "cEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, обозначаемой в данном документе "S-cEt".

iRNA по настоящему изобретению может также содержать один или более "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2'- и C4'-атомы углерода рибозы или C3'- и C5'-атомы углерода рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильную конформацию и повышает аффинность гибридизации с mRNA. Длина линкера является достаточной, чтобы поместить атом кислорода в положение, оптимальное для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему "сморщиванию" рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых изложено получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают без ограничения публикацию патента США № 2013/0190383 и публикацию согласно PCT WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды типа UNA (незапертая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незапертую ациклическую

нуклеиновую кислоту, в которой какая-либо из связей в сахарном фрагменте была удалена с образованием незапертого "сахарного" остатка. В одном примере UNA также охватывает мономер, у которого были удалены связи C1'-C4' (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') в сахарном фрагменте была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и *Fluiter et al., Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, настоящим включенные посредством ссылки).

Иллюстративные публикации патентов США, в которых изложено получение UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-O-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации согласно РСТ № WO 2011/005861.

Другие модификации нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата в антисмысловой нити iRNA. Подходящие миметики фосфатов раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы по настоящему изобретению

В определенных аспектах настоящего изобретения средства на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO2013/075035, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В WO2013/075035 предусмотрены мотивы трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловой нити или антисмысловой нити средства для dsRNAi, в частности в сайте расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для dsRNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение этих мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для dsRNAi может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc, например, посредством смысловой нити.

Более конкретно, в случае если смысловая нить и антисмысловая нить средства на основе двухнитевой РНК полностью модифицированы таким образом, что имеют один или более мотивов трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним по меньшей мере одной нити средства для dsRNAi, наблюдали активность средства для dsRNAi в отношении сайленсинга генов.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены средства на основе двухнитевой РНК, способные к подавлению экспрессии целевого гена (т. е. гена HMGB1) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для RNAi может независимо составлять 12-30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может независимо составлять 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 25-30 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.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для dsRNAi". Длина дуплексного участка средства для dsRNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 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 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi может содержать один или более участков выступающих концов или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может независимо составлять 1-6 нуклеотидов, например, 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. В определенных вариантах осуществления участки выступающих концов могут содержать удлиненные участки выступающих концов, предусмотренные выше. Наличие выступающих концов может быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или может быть результатом того, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибку спаривания с целевой mRNA, или он может быть комплементарен последовательностям генов, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием "шпильки" или с помощью других линкеров, не содержащих основания.

В определенных вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в участке выступающего конца средства для dsRNAi независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая без ограничения с 2'-модифицированным сахаром, такой как 2'-F-, 2'-О-метилтимидин (Т), 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и любые их комбинации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибку спаривания с целевой mRNA, или он может быть комплементарен последовательностям генов, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для dsRNAi могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий участок(и) содержит два нуклеотида с фосфотиоатной связью между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство для dsRNAi может содержать только один выступающий конец, который может повышать интерферирующую активность RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, односторонний выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или наоборот. Как правило, антисмысловая нить средства для dsRNAi имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, и при этом 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что асимметричные тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC.

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 19 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В других вариантах осуществления средство для dsRNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 20 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще нескольких других вариантах осуществления средство для dsRNAi представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 21 нуклеотид, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая

нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi является тупым, в то время как другой конец содержит выступающий конец из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити.

В случае если выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из этих трех нуклеотидов являются нуклеотидами выступающего конца, и третий нуклеотид является образующим пару нуклеотидом, следующим за нуклеотидом выступающего конца. В одном варианте осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для dsRNAi, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления каждый остаток является независимо модифицированным с помощью 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в виде чередующегося мотива. Необязательно, средство для dsRNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc₃).

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой нити содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым 3'-однонитевой выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые являются неспаренными со смысловой нитью, образуя тем самым 5'-однонитевой выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой нити, в случае если смысловая и антисмысловая нити выровнены для максимальной комплементарности, образуя тем самым фактически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой нити в длину для снижения экспрессии целевого гена при введении

двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для dsRNAi содержит первую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, и вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, для снижения экспрессии целевого гена, где средство для RNAi вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для dsRNAi с помощью Dicer предпочтительно приводит к образованию siRNA, содержащей 3'-конец второй нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно, средство для dsRNAi дополнительно содержит лиганд.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить средства для dsRNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить средства для dsRNAi может также содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в антисмысловой нити или рядом с ним.

В случае средства для dsRNAi, имеющего дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, например, длина составляет 17-23 пары оснований, сайт расщепления антисмысловой нити обычно находится около положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка средства для dsRNAi от 5'-конца.

Смысловая нить средства для dsRNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте

расщепления нити; и антисмысловая нить может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления нити или рядом с ним. В случае если смысловая нить и антисмысловая нить образуют dsRNA-дуплекс, смысловая нить и антисмысловая нить могут выравниваться таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований с по меньшей мере одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить средства для dsRNAi может содержать более чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе обозначает мотив, находящийся в другой части нити, которая отделена от мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним на той же нити. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена от него по меньшей мере одним или более нуклеотидами. В случае если мотивы непосредственно прилегают друг к другу, то химические структуры мотивов отличаются друг от друга, а в случае если мотивы разделены одним или более нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для dsRNAi может содержать более чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Эта антисмысловая нить может также содержать одну или более фланкирующих модификаций, которые при выравнивании имеют расположение, подобное фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для dsRNAi обычно не включает в себя один или два первых концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В других вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для dsRNAi обычно не включает один или два первых спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В случае если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для

dsRNAi содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, тогда фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В случае если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для dsRNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, тогда смысловая нить и антисмысловая нить могут выравниваться таким образом, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обеим сторонам от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для dsRNAi, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицированным. Каждый нуклеотид может быть модифицирован с помощью одинаковой или разной модификации, которые могут включать одно или более изменений одного или обоих не связанных с фосфатом атомов кислорода или одного или более 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.

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 одноститевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в одноститевом участке РНК. Например, фосфотиоатная 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 одноститевом участках, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в одноститевые выступающие концы, например в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включить

пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-О-метил-модифицированного вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификации в фосфатной группе, например, фосфотиоатные модификации. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными с целевой последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

Как правило, в смысловой нити и антисмысловой нити присутствуют по меньшей мере две различные модификации. Эти две модификации могут представлять собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации или другие.

В определенных вариантах осуществления N_a или N_b содержит модификации в виде чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, обозначает мотив с одной или более модификациями, при этом каждая модификация встречается в чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может обозначать каждый второй нуклеотид или каждый третий нуклеотид или аналогичный паттерн. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВВВВВВВ..." или "АВСВСВСВСВСВ..." и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации в нуклеотиде, то чередующийся паттерн, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но для каждой из смысловой нити или антисмысловой нити может существовать нескольких возможных вариантов модификаций в пределах чередующегося мотива, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т. д.

В некоторых вариантах осуществления для средства для dsRNAi по настоящему изобретению предусмотрено, что паттерн модификаций для чередующегося мотива на смысловой нити сдвинут относительно паттерна модификации для чередующегося мотива в антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует группе нуклеотидов антисмысловой нити, модифицированной другим способом, и наоборот. Например, при спаривании смысловой

нити с антисмысловой нитью в dsRNA-дуплексе чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, и чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, и чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью существует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В некоторых вариантах осуществления для средства для dsRNAi предусмотрено, что оно изначально имеет сдвиг паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити относительно паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т. е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в смысловой нити образует пару оснований с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и наоборот. Положение 1 в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, и 1 положение в антисмысловой нити может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает исходный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити или антисмысловой нити. Это нарушение паттерна модификаций смысловой или антисмысловой нити путем введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую или антисмысловую нить может повышать активность сайленсинга генов против целевого гена.

В некоторых вариантах осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N_aYYYN_b...", где "Y" представляет собой модификацию в виде мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "YYY", которая отличается от модификации Y, и при этом N_a и N_b могут представлять собой одинаковые или разные модификации. В качестве альтернативы N_a или N_b могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида в смысловой нити 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 могут содержать 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. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления средство для dsRNAi имеет фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для присоединения нуклеотидов выступающего конца к концевым спаренным нуклеотидам в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды выступающего конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие нуклеотид выступающего конца со спаренным нуклеотидом, который следует за нуклеотидом выступающего конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, и третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. Эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити или 5'-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. Необязательно, средство для dsRNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для dsRNAi содержит ошибку(-и) спаривания с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибка спаривания может

встречаться в участке выступающего конца или в дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар на основе индивидуальных пар, однако также можно использовать 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). Ошибки спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других частях данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); а типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

В определенных вариантах осуществления средство для dsRNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований от 5'-конца в пределах дуплексных участков антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из A:U, G:U, I:C и пар с ошибками спаривания, например, неканонических, или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное основание, чтобы содействовать диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

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

В других вариантах осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой нити представляет собой дезокситимин (dT), или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). Например, на 3'-конце смысловой, антисмысловой нити или обеих нитей присутствует короткая последовательность из дезокситиминовых нуклеотидов, например двух dT нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I),

$$5' \text{ } n_p\text{-}N_a\text{-(X X X)}_i\text{-}N_b\text{-Y Y Y -}N_b\text{-(Z Z Z)}_j\text{-}N_a\text{-}n_q \text{ } 3' \text{ (I)}$$

где:

каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из p и q независимо равняется 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную

последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца;

где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно, все нуклеотиды YYY представляют собой 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления N_a или N_b содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

В некоторых вариантах осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, в случае если средство для dsRNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив YYY может находиться в или вблизи сайта расщепления (например, может находиться в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка.

В одном варианте осуществления i равняется 1, и j равняется 0, или i равняется 0, и j равняется 1, или как i , так и j равняются 1. Таким образом, смысловая нить может быть представлена следующими формулами:

5' n_p - N_a -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_a - n_q 3' (Ic) или

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Id).

В случае если смысловая нить представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если смысловая нить представлена формулой (Ic), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если смысловая нить представлена формулой (Id), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N_b равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

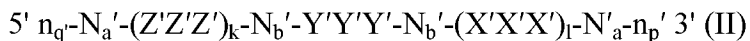
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

В других вариантах осуществления i равняется 0, а j равняется 0, и смысловая нить может быть представлена формулой:

5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3' (Ia).

В случае если смысловая нить представлена формулой (Ia), каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити средства для RNAi может быть представлена формулой (II),



где:

каждый из k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p' и q' независимо равняется 0-6;

каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n_p' и n_q' независимо представляют собой нуклеотид выступающего конца;

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

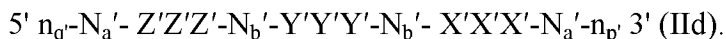
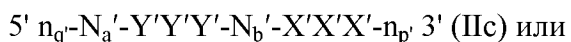
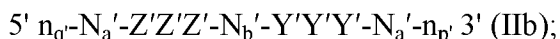
В некоторых вариантах осуществления N_a' или N_b' содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

Мотив $Y'Y'Y'$ встречается в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, в случае если средство для dsRNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив $Y'Y'Y'$ может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка. Предпочтительно, мотив $Y'Y'Y'$ находится в положениях 11, 12, 13.

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды мотива $Y'Y'Y'$ представляют собой 2'-ОМе-модифицированные нуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления k равняется 1, и l равняется 0, или k равняется 0, и l равняется 1, или как k , так и l равняются 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:



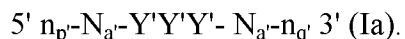
В случае если антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если антисмысловая нить представлена формулой (IIc), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если антисмысловая нить представлена формулой (IId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N_b равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления k равняется 0, и l равняется 0, и антисмысловая нить может быть представлена формулой:



В случае если антисмысловая нить представлена формулой (IIa), каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X' , Y' и Z' может быть одинаковым или отличным от остальных.

Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован с помощью LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора. Каждый X , Y , Z , X' , Y' и Z' , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить средства для dsRNAi может содержать мотив YYY , встречающийся в положениях 9, 10 и 11 нити, в случае если дуплексный участок состоит из 21 нуклеотида, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может содержать мотив $Y'Y'Y'$, встречающийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив $X'X'X'$

или мотивы $Z'Z'Z'$ в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из $X'X'X'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой нитью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId) соответственно.

Соответственно, средства для dsRNAi для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 30 нуклеотидов, при этом дуплекс iRNA представлен формулой (III),

смысловая нить: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b' - (Z Z Z)_j - N_a' - n_q 3'$

антисмысловая нить: $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$,

(III),

где:

каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p, p', q и q' независимо равняется 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где каждый n_p', n_p, n_q' и n_q , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца; и

каждый из XXX, YYY, ZZZ, $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

В одном варианте осуществления i равняется 0, и j равняется 0; или i равняется 1, и j равняется 0; или i равняется 0, и j равняется 1; или как i , так и j равняются 0; или как i , так и j равняются 1. В другом варианте осуществления k равняется 0, и l равняется 0; или k равняется 1, и l равняется 0; k равняется 0, и l равняется 1; или как k , так и l равняется 0; или так k , так и l равняются 1.

Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс iRNA, включают формулы, приведенные ниже:

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a' - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$

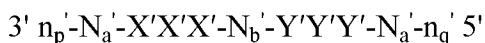
(IIIa)

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a' - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$

(IIIb)

$5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a' - n_q 3'$



(IIIc)



(IIIId)

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIa), каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIb), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

Каждый из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId) может быть одинаковым или отличным от остальных.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIb) или (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

В случае если средство для dsRNAi представлено формулой (IIIc) или (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X

образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' .

В определенных вариантах осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y' , модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z' , или модификация нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X' .

В определенных вариантах осуществления, в случае если средство для dsRNAi представлено формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В других вариантах осуществления, в случае если средство для RNAi представлено формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще нескольких других вариантах осуществления, в случае если средство для RNAi представлено формулой (III_d), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, и смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В других вариантах осуществления, в случае если средство для RNAi представлено формулой (III_a), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления, в случае если средство для dsRNAi представлено формулой (III_a), модификации N_a представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления средство для dsRNAi представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В некоторых вариантах осуществления средство для dsRNAi представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на

два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два средства для dsRNAi, представленные по меньшей мере одной из формул (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 или менее нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Например, средство для RNAi может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити. В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити.

В других вариантах осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению может содержать сверхмалое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 или меньше нуклеотидов, содержащих с 2'-фтор-модификацию. Например, средство для RNAi может содержать 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити.

В различных публикациях описаны мультимерные iRNA, которые можно применять в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

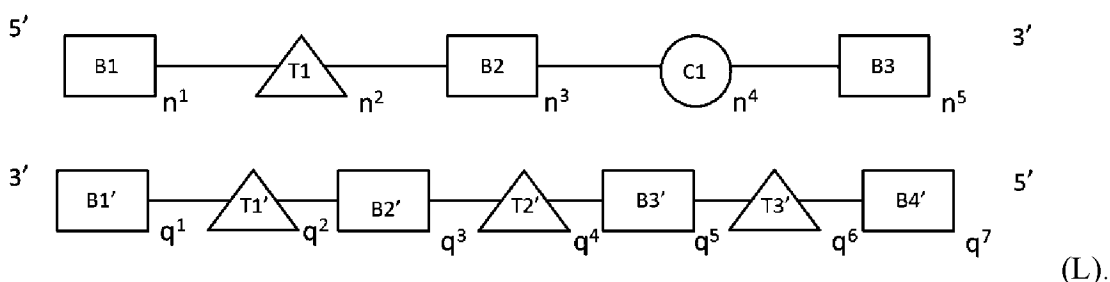
Как описано более подробно ниже, в случае iRNA, содержащей один или более углеводных фрагментов, конъюгированных с iRNA, может улучшаться одно или более свойств iRNA. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице iRNA. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц iRNA можно заменять на другой фрагмент, например, отличный от углевода (предпочтительно циклический) носитель, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, обозначают в данном документе как субъединицу с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую системой, т. е. все атомы в кольце

являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более атомов в кольце могут быть гетероатомом, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или более двойных связей.

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". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, обозначает функциональную группу, например гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную и подходящую для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например серосодержащий, остов рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления обозначает входящий в состав кольца атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный 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 или полисахарид. Необязательно, выбранный фрагмент присоединен к циклическому носителю посредством промежуточного связывающего фрагмента. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения другого химического структурного элемента, например лиганда, в состав кольца или связывания его с кольцом.

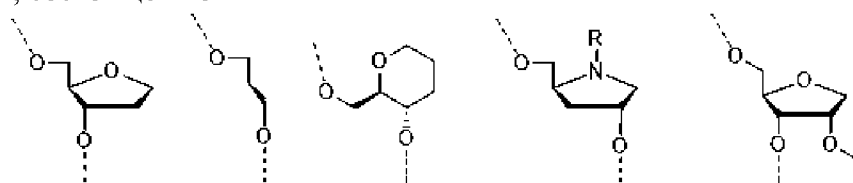
RNAi можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой сериол, или остова, представляющего собой диэтанолламин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения средство на основе iRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Средство для RNAi может быть представлено формулой (L):



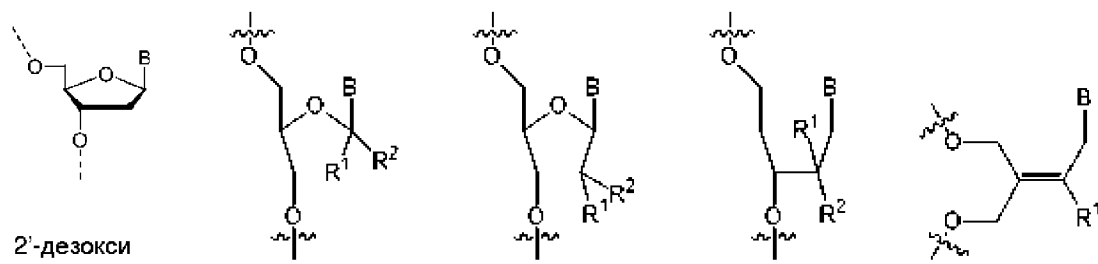
В формуле (L) каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМe-модификации. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМe- или 2'-F-модификации. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-O-N-метилацетидамо (2'-O-NMA)-модификацию.

C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид, помещенный в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити (т. е. находящемуся в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). Например, C1 находится в положении смысловой нити, которое образует пару с нуклеотидом в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой нити. Нуклеотид C1 несет нарушающую термостабильность модификацию, которая может включать модификацию с удалением азотистого основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом в дуплексе и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA). В одном варианте осуществления C1 имеет нарушающую термостабильность модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в антисмысловой нити; ii) модификации с удалением азотистого основания, выбранной из группы, состоящей из

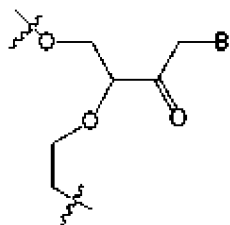


; и iii) модификации

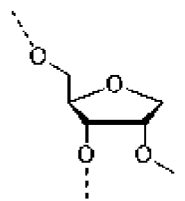
сахара, выбранной из группы, состоящей из



и



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. В одном варианте осуществления нарушающая термостабильность модификация в C1 представляет собой ошибочное спаривание, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и необязательно по меньшей мере одно нуклеиновое основание в ошибочно спаренной паре представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание. В одном примере нарушающая термостабильность



модификация в C1 представляет собой GNA или

Каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Стерический объем означает сумму стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может находиться в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида, или модификация может находиться в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остоле нуклеотида в положении, которое является аналогичным или подобным 2'-положению рибозного сахара, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Например, каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

Длина n^1 , n^3 и q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов.

Длина n^5 , q^3 и q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов.

Длина n^4 , q^2 и q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0.

Длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

Длина n^2 и q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида.

В качестве альтернативы длина n^4 составляет 0-3 нуклеотида.

В одном варианте осуществления n^4 может равняться 0. В одном примере n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1. В другом примере n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1, при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

В одном варианте осуществления каждый из n^4 , q^2 и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления каждый из n^2 , n^4 , q^2 , q^4 и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления C1 находится в положениях 14-17 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и n^4 равняется 1. В одном варианте осуществления C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой нити.

В одном варианте осуществления T3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления T1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^2 равняется 1.

В иллюстративном варианте осуществления T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^6 равняется 1, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^2 равняется 1.

В одном варианте осуществления T1' и T3' разделены участком длиной 11 нуклеотидов (т. е. без учета нуклеотидов T1' и T3').

В одном варианте осуществления T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^2 равняется 1, и модификация находится в 2'-положении или положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией.

В одном варианте осуществления T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^6 равняется 1, и модификация в 2'-положении или положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией, или объем, равный таковому.

В одном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, в случае

если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1. В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, в случае если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1.

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^4 равняется 1.

В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити, к примеру, в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, в случае если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^2 равняется 1, и модификация в T1' находится в 2'-положении рибозного сахара или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или осто́ве нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией; T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^4 равняется 1; и T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^6 равняется 1, и модификация T3' находится в 2'-положении или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или осто́ве нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией, или объем, равный таковому.

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^4 равняется 2.

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой нити. В одном примере T2' находится в положении 9 от 5'-конца антисмысловой нити, и q^4 равняется 1.

В одном варианте осуществления B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации ме́жнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации ме́жнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации ме́жнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

В одном варианте осуществления n^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации ме́жнуклеотидных связей в пределах

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 6, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные

модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

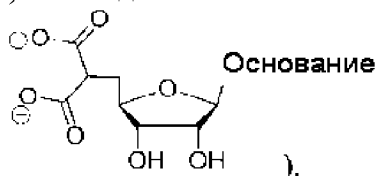
В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 5, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 5, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две

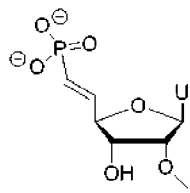
В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

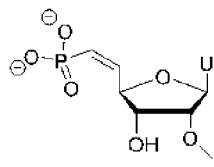
Средство для RNAi может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити или антисмысловой нити. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфотиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфодитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5'-дезоксид-5'-C-малонил ().



В случае если 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), то 5'-VP может представлять собой либо изомер 5'-E-VP



(т. е. *транс*-винилфосфат,), либо изомер 5'-Z-VP (т. е. *цис*-винилфосфат,



), либо их смеси.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити. В одном варианте осуществления средство для RNAi

содержит фосфорсодержащую группу на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-P. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-P в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-PS. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-PS в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-VP. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-VP в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-E-VP в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-Z-VP в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-PS₂ в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит 5'-дезоксид-5'-C-малонил в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n¹ равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n⁵ равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q¹ равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q³ равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q⁵ равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe, и q⁷ равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n¹ равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n⁵ равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q¹ равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q³ равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q⁵ равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe, и q⁷ равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n¹ равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n⁵ равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q¹ равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q³ равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q⁵ равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe, и q⁷ равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксипентановую-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотионатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотионатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотионатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, q⁴ равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксигуаносин-3'-фосфат малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксипентозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для dsRNAi на основе РНК также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксипентозин-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет

собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1. Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксид-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах

положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1

равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1

равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд.

В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксидеокси-

5'-C-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксид-5'-C-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-VP

(например, 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные

модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две

фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, q⁴ равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3

равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для RNAi также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-C-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-C-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и
 - (iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (считая от 5'-конца);
 - и
 - (b) антисмысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);
- где средства на основе dsRNA имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и
 - (iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1

и 2, а также между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10 и 12-21, 2'-F-модификации в положениях 7 и 9 и дезоксинуклеотид (например, dT) в положении 11 (считая от 5'-конца);

и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, а также между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4-6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14 и 16-21, а также 2'-F-модификации в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, а также между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-9 и 12-21, а также 2'-F-модификации в положениях 10 и 11; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, а также между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR

содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11 и 13, а также 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12 и 14-21; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, а также между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5-7, 9, 11-13, 15, 17-19 и 21-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 8, 10, 14, 16 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17 и 19-21, а также 2'-F-модификации в положениях 3, 5, 7, 9-11, 13, 16 и 18; и

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) длину, составляющую 25 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 4, 6, 7, 9, 11-13, 15, 17 и 19-23, 2'-F-модификации в положениях 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16 и 18, а также дезоксинуклеотиды (например, dT) в положениях 24 и 25 (считая от 5'-конца); и

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, а также 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и
 - (iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15 и 17-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, а также 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и
 - (iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит:

- (a) смысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 19 нуклеотидов;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-4, 6 и 10-19, а также 2'-F-модификации в положениях 5 и 7-9; и
 - (iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца);
 - и
 - (b) антисмысловую нить, имеющую
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 19 и 20 и между нуклеотидными положениями 20 и 21 (считая от 5'-конца);
- где средства для RNAi имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В определенных вариантах осуществления iRNA для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из средств, перечисленных в любой из таблиц 3, 5, 6 или 7. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

III. iRNA, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК из числа iRNA по настоящему изобретению предусматривает химическое связывание iRNA с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, распределение в клетке или поглощение iRNA клетками, например, в клетке. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). В других вариантах осуществления лиганд представляет собой холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl.*

Acids Res., 1990, 18:3777-3783), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tempahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или октадециламинный или гексиламинокарбонилкохлестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В определенных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства на основе iRNA, в которое он встроен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, как, например, по сравнению с молекулами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не принимают участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновую кислоту) или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. 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 (НМРА), 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.

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, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида. В определенных вариантах осуществления лиганд

представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилглюкозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, 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, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилитель транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклы), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении колиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать молекулы, отличные от пептидов, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может повышать поступление средства на основе iRNA в клетку, например путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксол, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к iRNA, описанный в данном документе, действует в качестве фармакокинетического модулятора (РК-модулятор). РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохоловую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей,

связываются с сывороточным белком, поэтому короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остовах, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). В дополнение, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в данном документе.

Конъюгированные с лигандами iRNA по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такого как полученный в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы как несущие любую из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать с помощью удобной и стандартной методики хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуется несколькими компаниями-производителями, включая, например, Applied Biosystems® (Фостер Сити, Калифорния). В качестве дополнения или альтернативы можно применять любые другие способы такого синтеза, известные в данной области техники. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированные с лигандом iRNA и последовательность-специфические связанные нуклеозиды, несущие молекулу-лиганд, по настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем ДНК-синтезаторе с применением стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов лиганд-нуклеотид или -нуклеозид, которые уже несут молекулу-лиганд, или отличных от нуклеозида структурных блоков, несущих лиганд.

При применении предшественников конъюгатов нуклеотидов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов, как правило, завершают, а затем осуществляют реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в

олигонуклеотидном синтезе.

А. Липидные конъюгаты

В определенных вариантах осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, в отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно применять другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно применять напроксен или аспирин. Липид или липидный лиганд может (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (б) улучшать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану или (с) может быть использован для корректирования связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для подавления, например, для контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который менее прочно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В определенных вариантах осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно он связывает HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткани, отличной от ткани почек. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В других вариантах осуществления лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или вообще не связывается с ним, поэтому конъюгат предпочтительно будет распределяться в почках. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать в дополнение к лиганду на основе липида или вместо него.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например витамин, который поглощается целевой клеткой, например пролиферирующей клеткой. Такие лиганды особенно применимы для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например злокачественного или доброкачественного типа, например раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамины А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины, или нутриенты, поглощаемые целевыми клетками, например, клетками печени. Также включены HAS и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку

В другом аспекте 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 antennopodia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, в том числе содержать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, а также для него могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазы.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также обозначаемый в данном документе как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную к укладке в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к средствам на основе iRNA может воздействовать на фармакокинетическое распределение iRNA, например, путем повышения степени распознавания и абсорбции клеткой. 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.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, главным образом состоящий из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 13). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:14)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить крупные полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:15)) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:16)) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, идентифицированный в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примерами пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством встроенной мономерной структурной единицы, предназначенного для нацеливания на клетку, является пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Длина пептидного фрагмента может варьироваться 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.

RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, что облегчает нацеливание на конкретную ткань (конкретные ткани). Пептиды и пептидомиметики, содержащие RGD, могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегринов. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацеливаются на PECAM-1 или VEGF.

“Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку” способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, обеспечивающим проникновение в микробную клетку, например, может быть α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из крупного Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

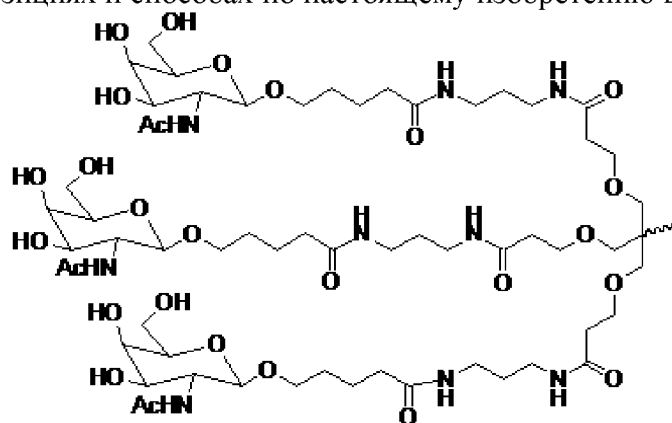
С. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению iRNA дополнительно содержит углевод. iRNA, конъюгированная с углеводом, предпочтительна для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для *in vivo* терапевтического применения, как это описано в данном документе. Используемый в данном документе термин “углевод” обозначает соединение, которое представляет собой либо углевод *per se*, образованный из одной или более моносакхаридных структурных единиц, 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; либо соединение, частью которого является углеводный фрагмент, образованный из одной или более моносакхаридных структурных единиц, каждая 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, 5, 6, 7, 8 или 9 моносакхаридных структурных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносакхариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают

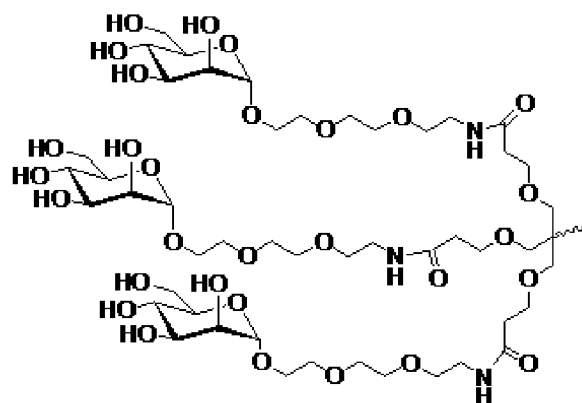
сахара с двумя или тремя моносахаридными структурными единицами (например, C5, C6, C7 или C8).

В определенных вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид.

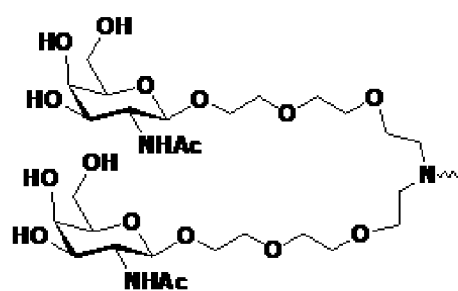
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



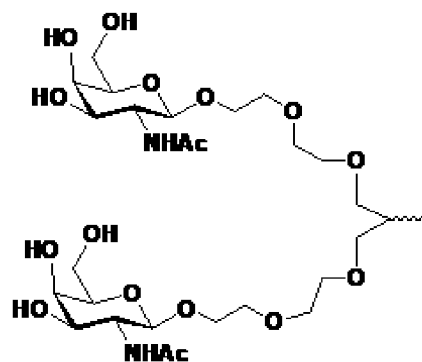
формулы II,



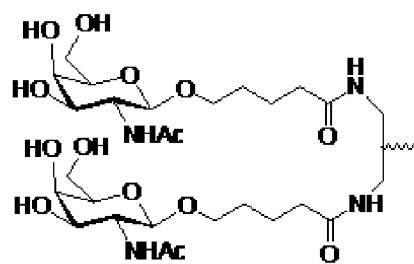
формулы III,



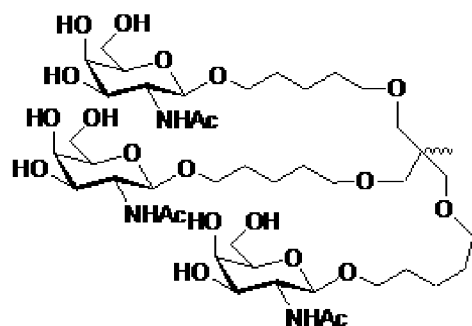
формулы IV,



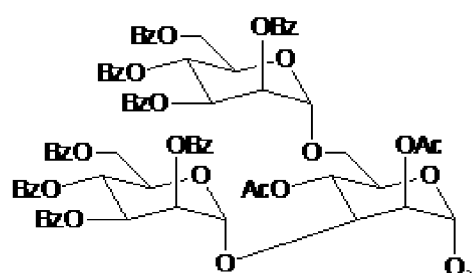
формулы V,



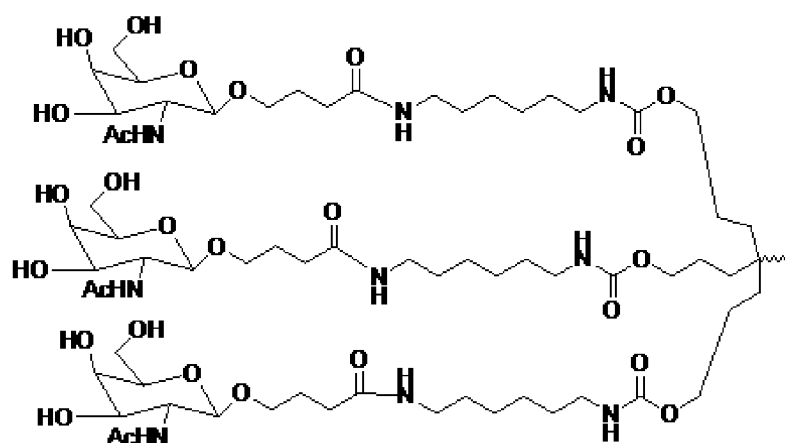
формулы VI,



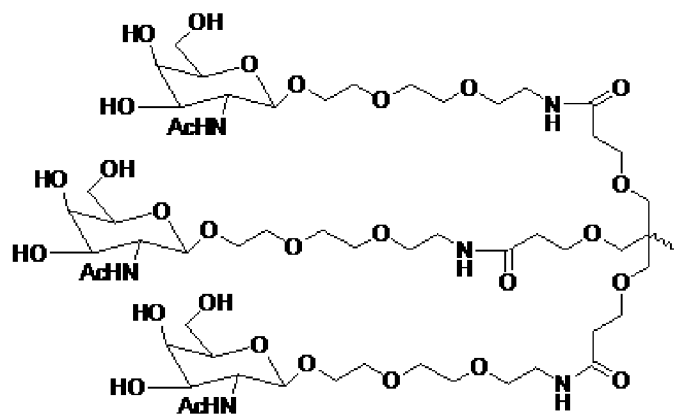
формулы VII,



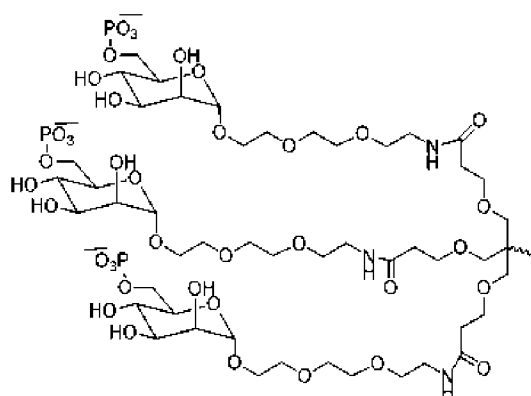
формулы VIII,



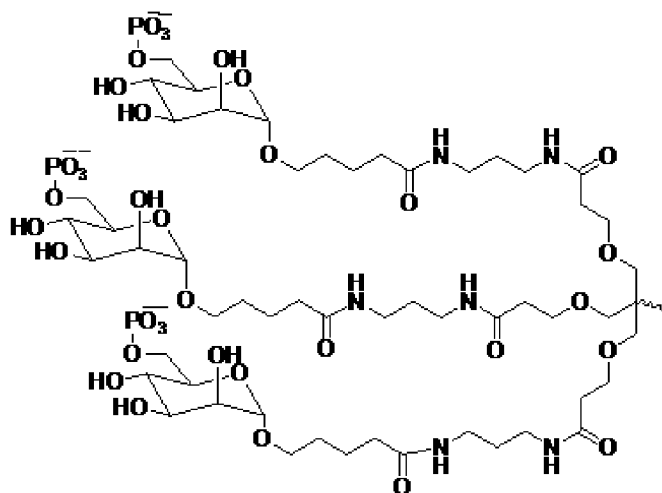
формулы IX,



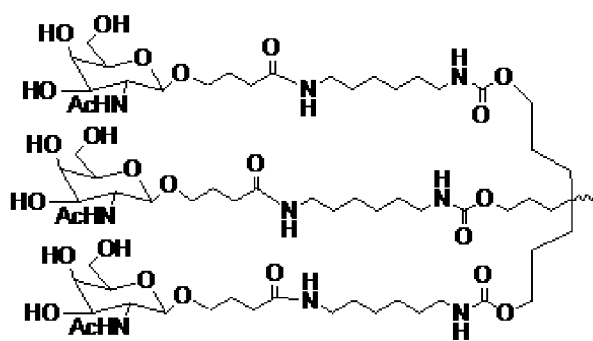
формулы X,



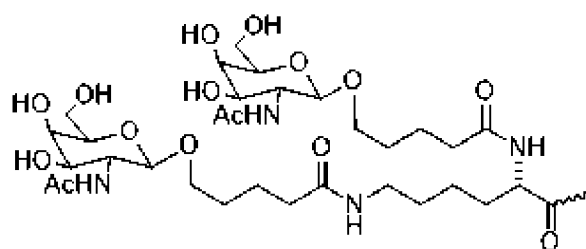
формулы XI,



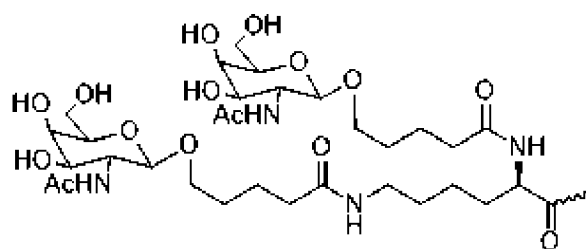
формулы XII,



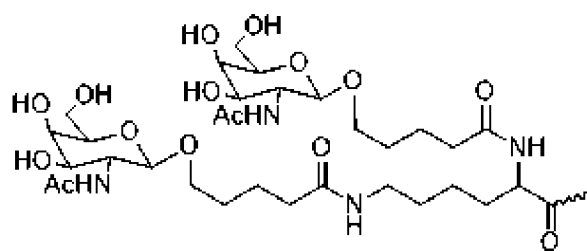
формулы XIII,



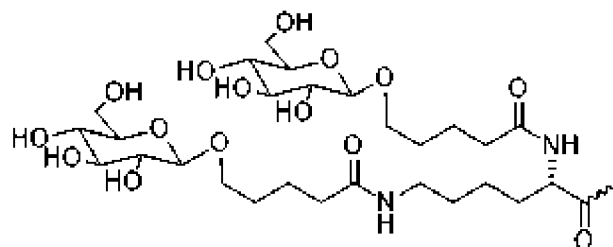
формулы XIV,



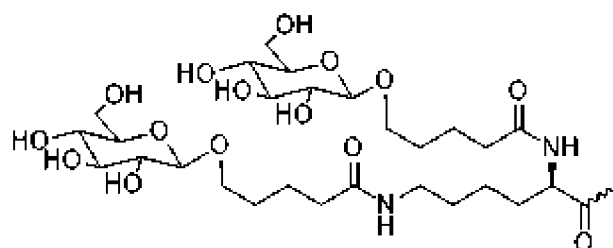
формулы XV,



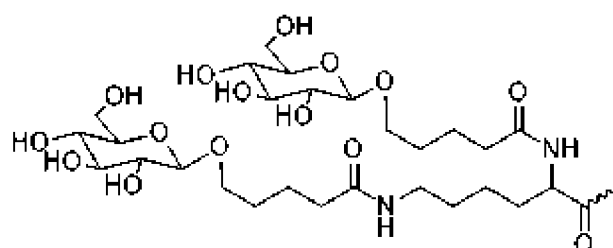
формулы XVI,



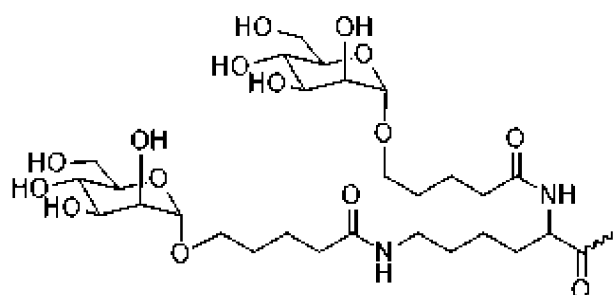
формулы XVII,



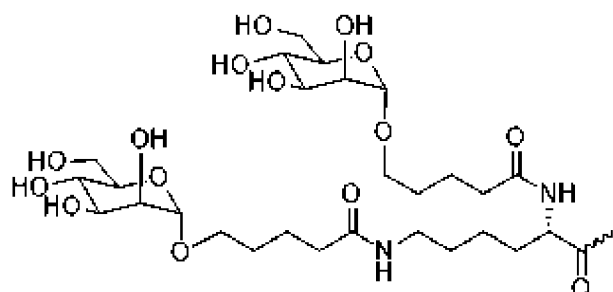
формулы XVIII,



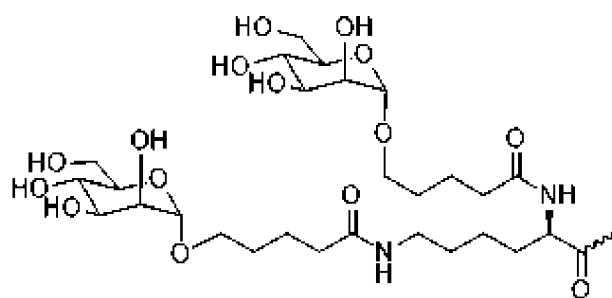
формулы XIX,



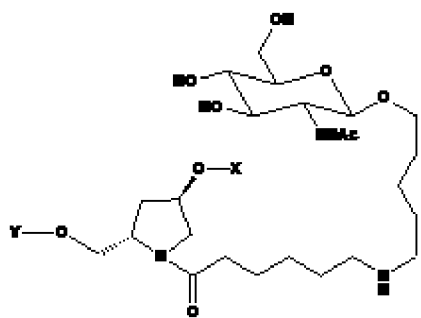
формулы XX,



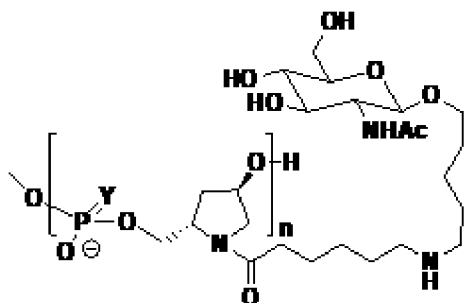
формулы XXI,



формулы XXII,

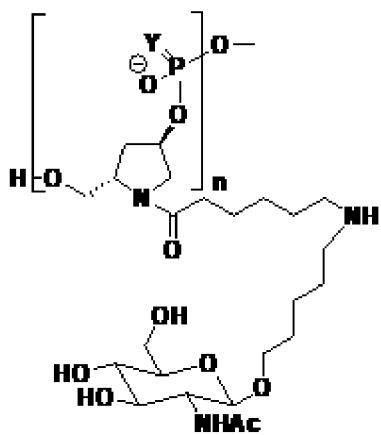


формулы XXIII;



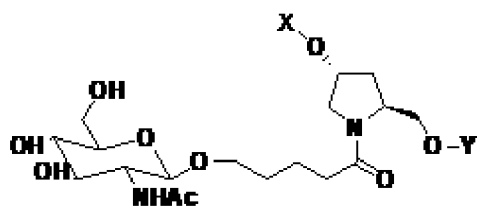
, где Y представляет собой O или S и n равняется

3-6 (формула XXIV);

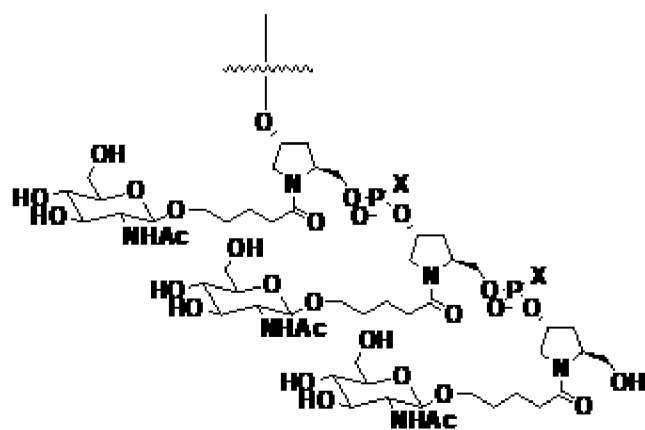


, где Y представляет собой O или S и n равняется 3-6

(формула XXV);

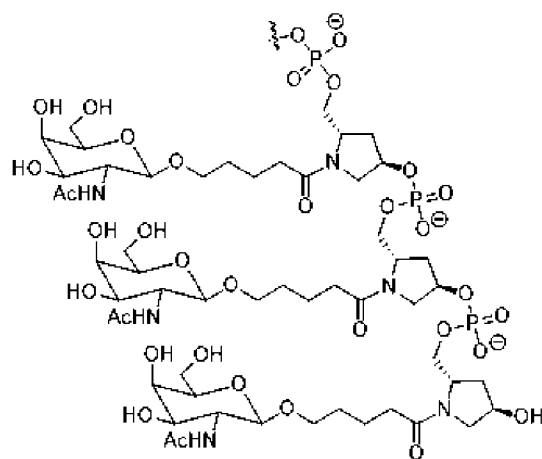
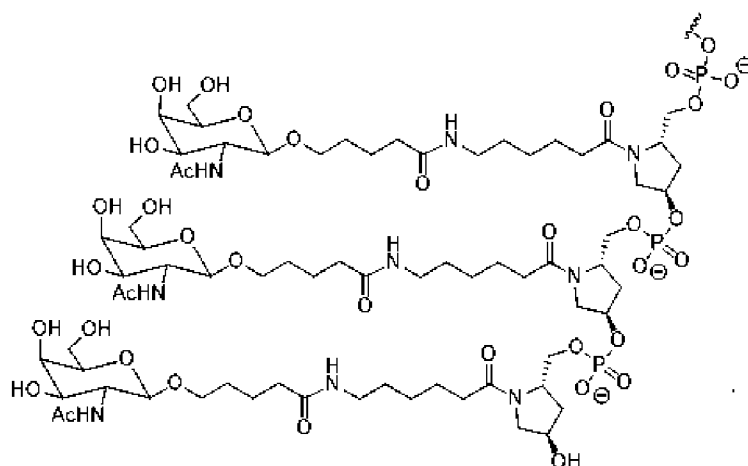


формулы XXVI;



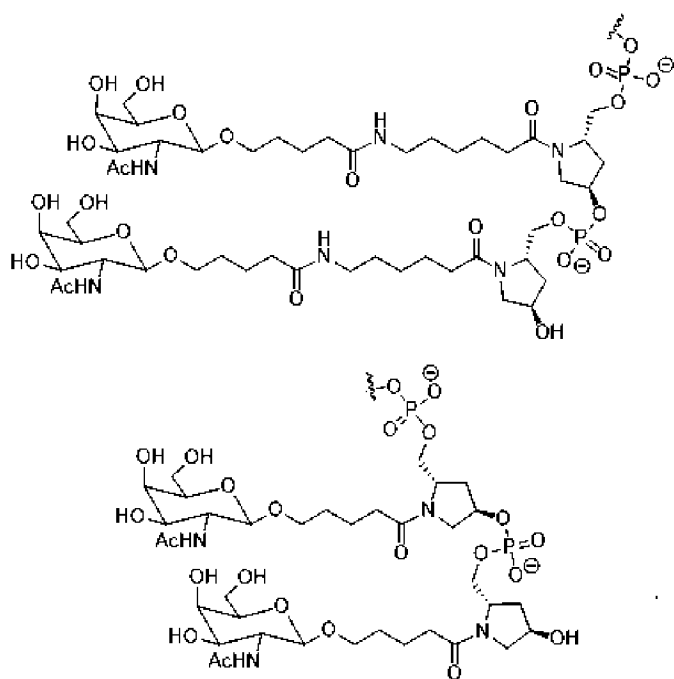
, где X представляет собой O или S

(формула XXVII);



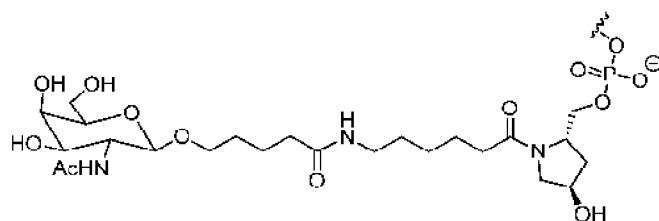
формулы XXVII; формулы

XXIX;

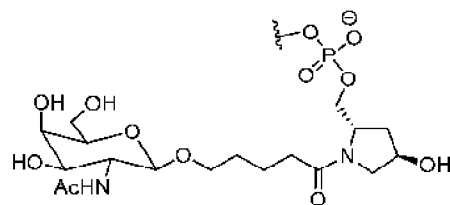


формулы XXX; формулы

XXXI;

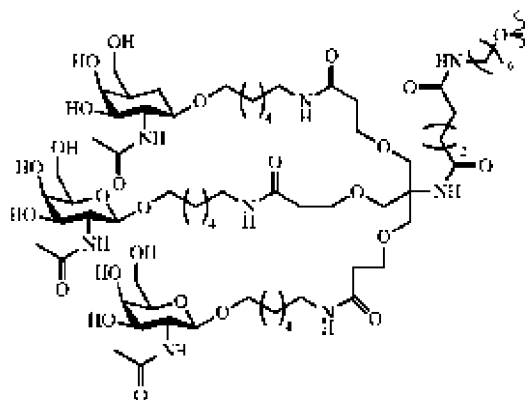


и



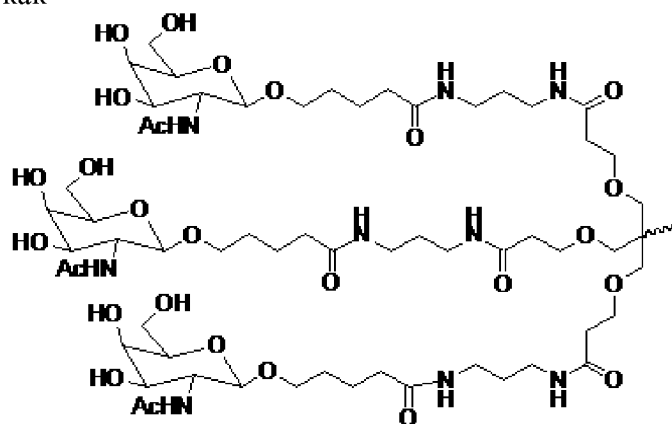
формулы XXXII; формулы

XXXIII.



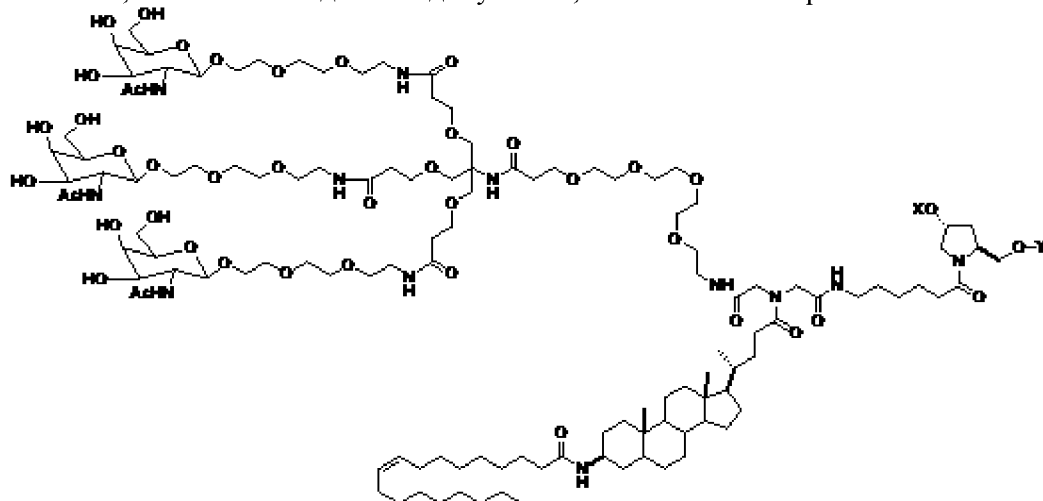
Формулы XXXIV.

В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



формула II.

Другой иллюстративный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



(формула XXXVI),

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, при этом другой представляет собой водород.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. В еще нескольких других вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе iRNA по настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

В одном варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенные к средству на основе iRNA, например, 5'-концу смысловой нити средства на основе dsRNA или 5'-

концу одной или обеих смысловых нитей двухнитевого нацеливающегося средства для RNAi, описанного в данном документе. В другом варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат несколько (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждый из которых независимо присоединен к нескольким нуклеотидам двухнитевого средства для RNAi посредством нескольких одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, если две нити средства на основе iRNA по настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующей петлю типа "шпилька", содержащую несколько неспаренных нуклеотидов, то каждый неспаренный нуклеотид в пределах петли типа "шпилька" может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные посредством одновалентного линкера.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как без ограничения РК-модулятор или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают описанные в публикациях согласно РСТ №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду iRNA с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как атом кислорода или серы, структурную единицу, такую как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил,

алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в котором один или более метиленов могут прерываться или заканчиваться O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом или замещенным или незамещенным гетероциклилом; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический компонент. В одном варианте осуществления линкер состоит из приблизительно 1-24 атомов, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая после поступления в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в по меньшей мере приблизительно 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или в по меньшей мере 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом эталонном условии (которое можно выбрать, например, чтобы оно имитировало или моделировало внутриклеточные условия), чем в крови субъекта или при втором эталонном условии (которое можно выбрать, например, чтобы оно имитировало или моделировало условия, свойственные крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к факторам расщепления, например, показателю pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления преобладают или встречаются на более высоких уровнях или обладают большей активностью внутри клеток, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к показателю pH, составляющему пять или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к показателю pH. Показатель pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как средний показатель pH внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым показателем pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым показателем pH, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного показателя pH,

вследствие чего катионный липид высвобождается из лиганда внутри клетки или в требуемом компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

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

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценить путем 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 определять относительную чувствительность к расщеплению при первом и втором условиях, где первое выбирают, чтобы продемонстрировать расщепление в целевой клетке, а второе выбирают, чтобы продемонстрировать расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно провести первичное оценивание в бесклеточных условиях или условиях культуры и подтвердить путем дальнейшего оценивания на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

і. Линкерные группы, расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций

В определенных вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, подходит ли кандидатная расщепляемая линкерная группа в качестве "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходит ли для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным

нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидатное соединение можно оценивать путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например целевой клетке. Кандидатные соединения также можно оценивать в условиях, которые выбирают для имитации условий крови или сыворотки крови. В одном варианте осуществления расщепление кандидатных соединений в крови составляет не более приблизительно 10%. В других вариантах осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в *in vitro* условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или *in vitro* условиями, выбранными для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с применением стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Фосфатные расщепляемые линкерные группы

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется под действием средств, которые разрушают или осуществляют гидролиз фосфатной группы. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. 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- и -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде при показателе pH, составляющем приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или с помощью таких средств, как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке специфические органеллы, характеризующиеся низким показателем pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить расщепляющую среду для 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 кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

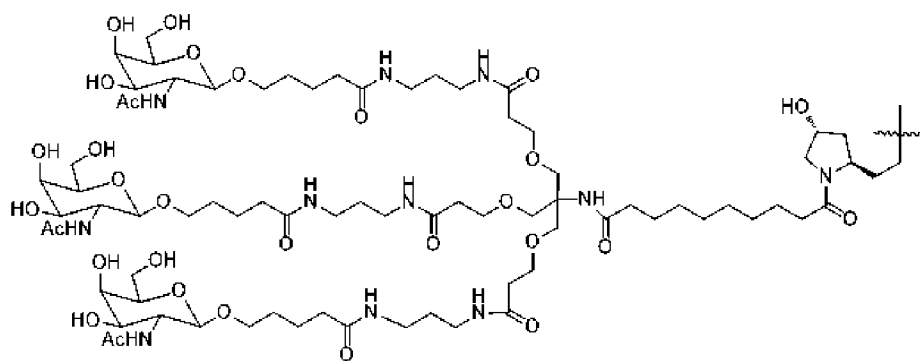
iv. Сложноэфирные линкерные группы

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную расщепляемую линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложноэфирные производные алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

v. Пептидные расщепляемые группы

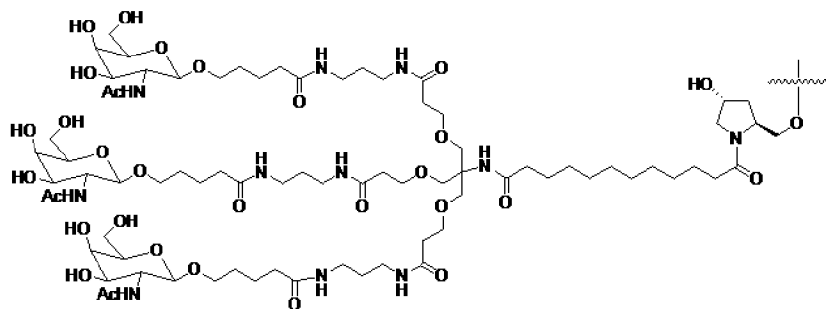
В еще нескольких других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую линкерную группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках под действием ферментов, таких как пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образуемые между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образуемый между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образуемой между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов iRNA с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению включают без ограничения

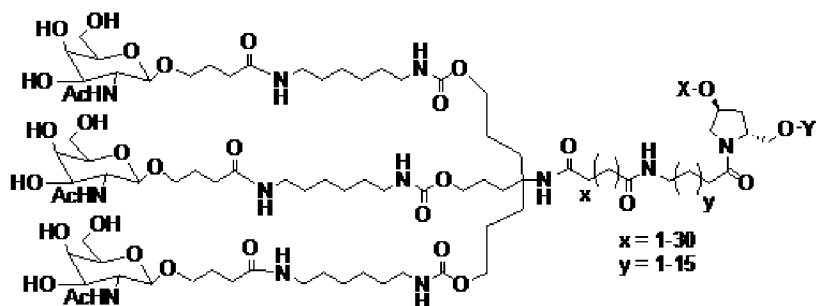


(формула

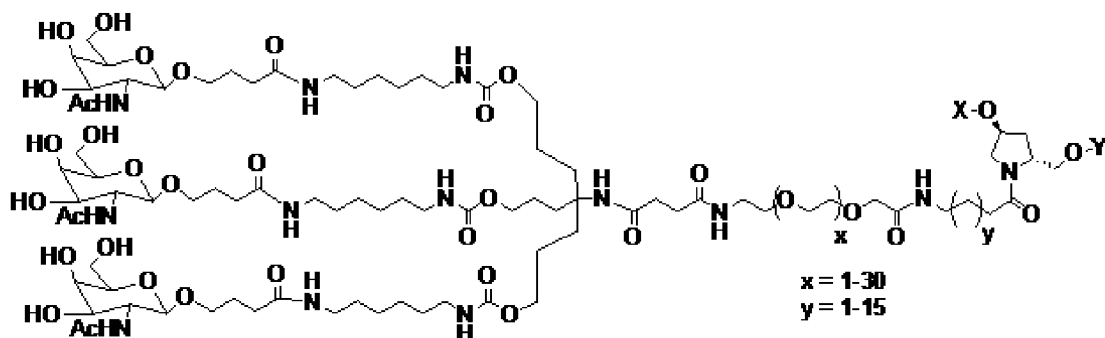
XXXVII),



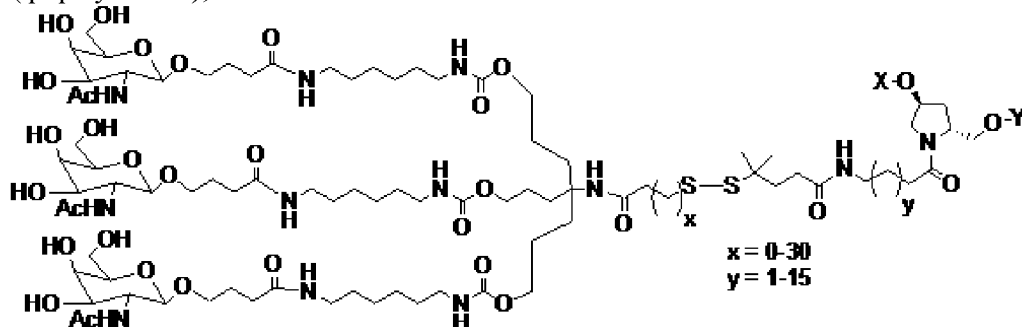
(формула XXXVIII),



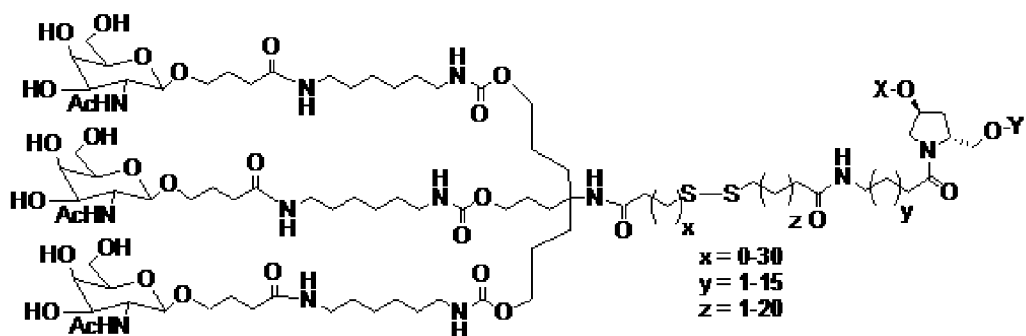
(формула XXXIX),



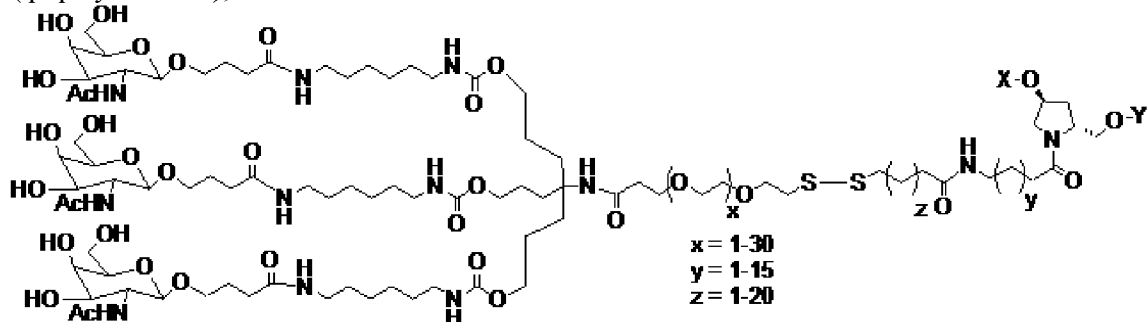
(формула XL),



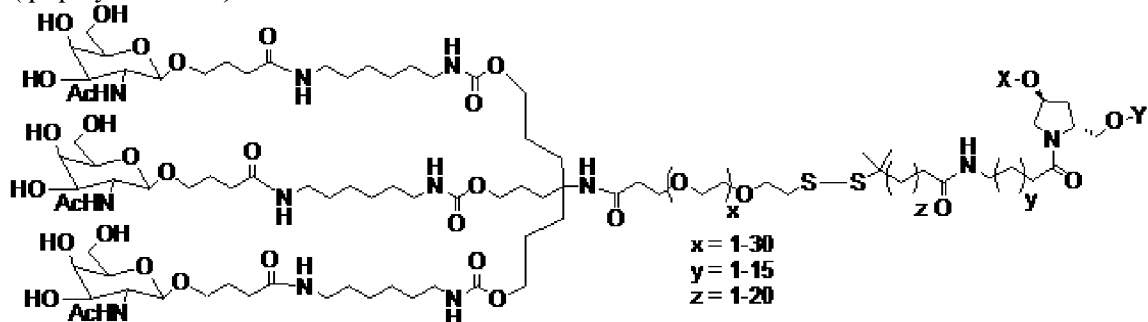
(формула XLI),



(формула XLII),



(формула XLIII) и



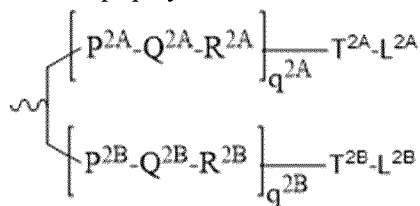
(формула XLIV),

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, а другой представляет собой водород.

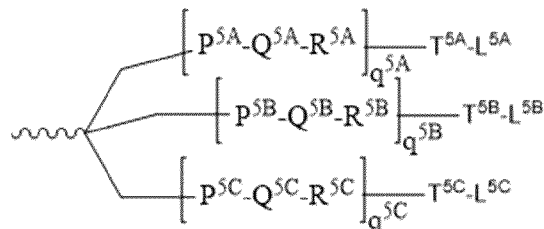
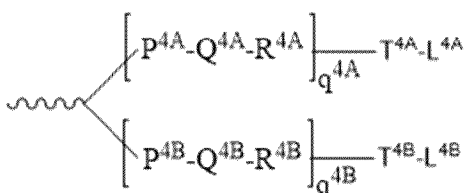
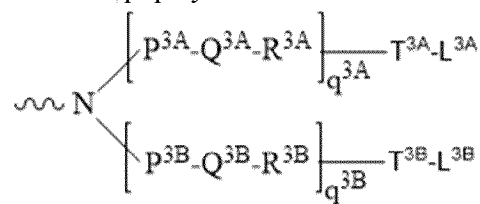
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или более производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

формула XXXV



формула XLVI



, или

формула XLVII

формула XLVIII

где:

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

каждый из P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{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 один или более метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

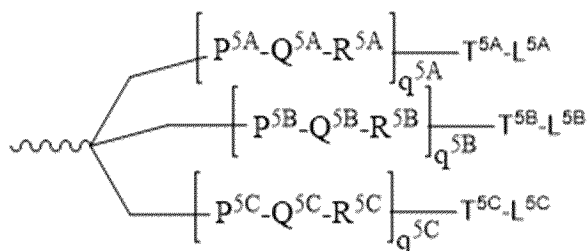
каждая из R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-



L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляет собой лиганд; т. е. каждый из них 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. Трехвалентные линкеры, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, особенно применимы в использовании со средствами для RNAi для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как характеризующиеся

формулой (XLIX):

формула XLIX



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNac, включают без ограничения структуры, указанные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США №№ 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646 и 8,106,022, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Необязательно, чтобы все положения в указанном соединении были модифицированы однотипно, и, по сути, более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения на основе iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе iRNA, предпочтительно средства для dsRNAi, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит из по меньшей мере одной мономерной структурной единицы, т. е. нуклеотида в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована с тем, чтобы придать iRNA повышенную устойчивость к разрушению нуклеазами, повышенное поглощение клеткой или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H

представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени, вследствие чего значительно повышается эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, зачастую, если применять химерные dsRNA, сравнимые результаты можно получить с более короткими iRNA по сравнению с фосфотиоатными дезокси-dsRNA, гибридизирующимися с тем же целевым участком. Расщепление РНК-мишени традиционно можно обнаруживать с помощью гель-электрофореза и при необходимости с помощью ассоциированных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Целый ряд молекул, не являющихся лигандами, был конъюгирован с iRNA для усиления активности, распределения в клетках или поглощения iRNA клеткой, и процедуры для выполнения таких типов конъюгации доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическая цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиаминовая или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусная кислота (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламинный или гексиламинокарбонилноксихолестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгации предусматривают синтез РНК, несущих линкер с аминогруппой в одном или более положениях последовательности. Затем аминогруппа вступает в реакцию с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего конденсирующего или активирующего реагентов. Реакцию конъюгации можно выполнять либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК, в фазе раствора. Очистка РНК-конъюгата с помощью HPLC, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

IV. Доставка iRNA по настоящему изобретению

Доставку iRNA по настоящему изобретению к клетке, например клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, нуждающийся в этом субъект, такой как субъект с

риском развития метаболического нарушения или у которого оно диагностировано, например, обусловленного недостаточностью гликемического контроля) можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. *In vivo* доставку также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. В качестве альтернативы *in vivo* доставку можно осуществлять опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно обсуждаются ниже.

В целом любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Что касается *in vivo* доставки, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань, или местного применения препарата. Локальное введение в участок, подлежащий лечению, максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. С помощью нескольких исследований было показано эффективное обусловленное нокдауном снижение уровней продуктов генов при локальном введении средства для dsRNAi. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ, *et al* (2004) *Retina* 24:132-138), так и путем субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждает неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам снижает объем опухолей (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать жизнь мышам, несущим опухоль (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Было показано, что РНК-интерференция была также успешной при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G., *et al* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). В случае системного введения iRNA для предупреждения инфекции может модифицировать РНК или в качестве альтернативы

доставлять ее с помощью системы для доставки лекарственного средства; при этом оба способа предотвращают быстрое разрушение dsRNA под воздействием эндо- и экзонуклеаз *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать нацеливание iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать неблагоприятных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать с помощью химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для увеличения поглощения клеткой и предотвращения разрушения. Например, iRNA, направленную против AroB, которая конъюгирована с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, вводили системно мышам, что приводило к нокдауну mRNA aroB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178). Было показано, что конъюгация iRNA с аптамером подавляет рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинной модели рака предстательной железы (McNamara, JO, *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем для доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система для доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно либо связывать с iRNA, либо индуцировать для образования везикулы или мицеллы (см. например, Kim SH, *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе iRNA. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионный липид-iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см. например, Sorensen, DR, *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, *et al* (2003) *Clin. Pak Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем для доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003) выше; Verma, UN, *et al* (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY, *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды, содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), и полиамидамины (Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции на основе iRNA и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

А. Кодированные вектором iRNA по настоящему изобретению

iRNA, целенаправленно воздействующая на ген HMGB1, может экспрессироваться за счет единиц транскрипции, встроенных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skilleen, A, *et al.*, публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка нескольких часов - недель) или длительной (недели - месяцы или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевой ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также можно конструировать с возможностью его наследования в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора в векторе экспрессии. Если следует экспрессировать две отдельные нити для получения, например dsRNA, в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В качестве альтернативы каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться за счет промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии iRNA, как правило, представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Чтобы получать рекомбинантные конструкции для экспрессии iRNA, описанные в данном документе, можно использовать векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных. Векторы для экспрессии в эукариотических клетках хорошо известны из уровня техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусматривается, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или с помощью любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в требуемую целевую клетку.

Системы на основе вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиноного лейкоза Молони и т. д; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвирус,

например, поксвируса канареек или вируса оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. Для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках в конструкции для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут предусматриваться регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т. д. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, известны из уровня техники.

V. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, применимы для предупреждения или лечения ассоциированного с HMGB1 нарушения, например, метаболического нарушения или NAFLD, например, NASH. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для подавления экспрессии гена HMGB1.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для подавления экспрессии гена HMGB1. Как правило, подходящая доза iRNA по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм веса тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм веса тела в день. Как правило, подходящая доза iRNA по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,0 мг/кг. Схема с повторным введением доз может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как, например, один раз в месяц, один раз каждые 3-6 месяцев или один раз в год. В определенных вариантах осуществления iRNA вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в шесть месяцев.

По завершению схемы начального лечения лекарственные можно вводить с меньшей частотой. По завершению схемы начального лечения лечение можно проводить с меньшей частотой.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с

интервалами не более 1, 2, 3, или 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в месяц. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в квартал (т. е., приблизительно один раз в три месяца). В других вариантах осуществления настоящего изобретения, однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в год (т. е. приблизительно один раз каждые шесть месяцев).

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения мутации, присутствующие у субъекта, виды предшествующего лечения, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие сопутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта с помощью профилактически или терапевтически эффективного количества композиции может включать один период лечения или более периодов лечения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, требуется ли локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсuffляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например, посредством имплантированного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное введение.

iRNA можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань, такую как печень (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т. п. Также могут быть применимы презервативы, перчатки с покрытием и т. п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например,

димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин DOTMA). iRNA, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C₁₋₂₀алкильные эфиры (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или минитаблетки. Могут потребоваться загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, представленные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или более усилителями проникновения, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсodeзоксихенодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, таурodeзоксichoлевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновая кислота и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир.

Представленные в настоящем изобретении dsRNA могут доставляться перорально, в форме гранул, в том числе высушенных распылением частиц, или в составе комплексов для образования микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксетаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные разновидности желатина, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полииминов, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинотетилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы на основе dsRNA для перорального введения и их получение подробно описаны в патенте США № 6887906, в публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутripеченочного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как без усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из разных компонентов, которые включают без ограничения предварительно образованные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Составы включают такие, которые нацеливаются на печень.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам, хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или наполнителем (наполнителями). Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем при необходимости придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как без ограничения таблетки, капсулы,

желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

А. Дополнительные составы

i. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см. например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии зачастую представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В случае если водная фаза измельчена и диспергирована в виде мельчайших капелек в общем объеме масляной фазы, полученную в результате композицию называют эмульсией "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, когда масляная фаза измельчена и диспергирована в виде мельчайших капелек в общем объеме водной фазы, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты помимо диспергированных фаз и активного лекарственного средства, которое может присутствовать либо в виде раствора в водной фазе, масляной фазе, либо само по себе в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w заключают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, дает эмульсию по типу

o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической стабильностью либо ее отсутствием. Зачастую диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме с помощью эмульгаторов или за счет вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсии мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть разделены на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные основы и тонкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составлении эмульсий, и они были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества было названо гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно представляет собой ценный инструмент для распределения на категории и выбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества могут быть разделены на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см. например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, применяемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, поэтому они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу w/o, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также применялись в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов,

ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или тристеарат глицерина.

В эмульсионные составы также включают множество неэмульгирующих материалов, и они обуславливают определенные свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагенан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии зачастую содержат целый ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые благоприятны для поддержания роста микроорганизмов, то данные составы часто включают консерванты. Общеупотребительные консерванты, включаемые в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Для предупреждения ухудшения качества состава в эмульсионные составы также обычно добавляют антиоксиданты. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой акцепторы свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергисты антиоксидантов, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дермального, перорального и парентерального путей и способы их получения рассмотрены в литературе (см. например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки применялись очень широко из-за удобства составления, а также с точки зрения эффективности абсорбции и биодоступности (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott

Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жиров входят в число материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу масло-в-воде.

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Определение микроэмульсии можно дать как системе из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см. например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают вначале путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются пленками из межфазными пленками из поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают посредством объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области техники были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Преимущество микроэмульсий

по сравнению с традиционными эмульсиями состоит в солюбилизации не растворимых в воде лекарственных средств в составе из термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокаприлат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с дополнительными поверхностно-активными веществами. Дополнительное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся короткоцепочечным спиртом, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося между молекулами поверхностно-активного вещества. При этом микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и из уровня техники известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать без ограничения такие материалы, как Captex® 300, Captex® 355, Capmul® MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12) моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C8-C10глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес в плане солюбилизации лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как по типу "масло в воде", так и по типу "вода в масле") были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного повышения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембран, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенной клинической эффективности и сниженной токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Но

et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Зачастую микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может иметь особенное преимущество, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными в трансдермальной доставке активных компонентов в случаях применения как в косметологии, так и в фармации. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill® 3), Labrasol® и усилители проникновения, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители проникновения, применяемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

iii. Микрочастицы

iRNA по настоящему изобретению может быть включена в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать путем высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, вакуумной сушкой или при помощи комбинации данных методик.

iv. Усилители проникновения

В одном варианте осуществления настоящего изобретения разнообразные усилители проникновения используют для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана усилителем проникновения. В дополнение к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug

delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92).

Каждый из вышеуказанных классов усилителей проникновения более подробно описан ниже.

Сурфактанты (или "поверхностно-активные средства") являются химическими частицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам данные усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92) и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые выступают в роли усилителей проникновения, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C₁₋₂₀алкильные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т. е. олеат, лаурат, капрат, миристан, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает облегчение диспергирования и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные выступают в роли усилителей проникновения. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает любые из встречающихся в природе компонентов желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту

(хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Можно дать определение хелатирующим средствам, используемым вместе с настоящим изобретением, как соединениям, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, то хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом в том, что они также служат ингибиторами ДНКаз, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и вследствие этого ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат, 5-метоксисалицилат и гомовалинат натрия), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9- и N-аминоацильные производные бета-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Можно дать определение применяемым в данном документе нехелатирующим соединениям, способствующим проникновению, которые не являются поверхностно-активными, как соединениям, которые демонстрируют незначительную активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, усиливают абсорбцию iRNA через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Данный класс усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические соединения мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканона (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как

полилизин (Lollo *et al.*, заявка согласно PCT WO 97/30731), также, как известно, повышают поглощение dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны, и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Носители

В состав некоторых композиций по настоящему изобретению также входят соединения-носители. Используемые в данном документе "соединение-носитель" или "носитель" может обозначать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (т. е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее

удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может приводить к существенному снижению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемой в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфотиоатной dsRNA в ткани печени может быть снижено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Наполнители

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду-носитель, предназначенную для доставки одной или более нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения так, чтобы обеспечить необходимый общий объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т. д.); заполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, стеараты магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, в таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические

наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

vii. Другие компоненты

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как например противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, применимые для физического составления композиций по настоящему изобретению в виде различных лекарственных форм, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны в значительной степени препятствовать проявлению биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно подвергать стерилизации и при необходимости смешиванию со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами или отдушками и т. п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой кислотой (нуклеиновыми кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, содержат (a) одно или более средств на основе iRNA и (b) одно или более средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые применимы в лечении метаболического нарушения, например, обусловленного недостаточностью гликемического контроля.

Токсичность и профилактическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, вызывающей гибель 50% в популяции) и ED50 (дозы, являющейся профилактически эффективной для 50% в популяции). Соотношение доз, обуславливающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах на культурах клеток и в исследованиях на животных, можно применять при составлении диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении дозировка композиций, представленных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих в крови концентраций, который включает ED50, предпочтительно ED80 или ED90, с низкой токсичностью или с отсутствием токсичности. Дозировка может варьироваться в данном диапазоне в зависимости от используемых лекарственной формы и пути введения. Для любого соединения, используемого в способах, представленных в настоящем изобретении, профилактически эффективную дозу можно исходно установить по результатам анализов на культурах клеток. В случае животных моделей дозу можно составлять таким образом, чтобы достичь диапазона концентрации соединения или при необходимости полипептидного продукта целевой последовательности, циркулирующих в плазме крови (например, достижения сниженной концентрации полипептида), что включает IC50 (т. е. концентрацию исследуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное подавление симптомов) или более высоких уровней подавления, как это определено на культуре клеток. Такую информацию можно применять для более точного определения доз, применимых у людей. Уровни в плазме крови можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, применяемыми для предупреждения или лечения метаболического нарушения, например, обусловленного недостаточностью гликемического контроля. В любом случае врач, осуществляющие применение, может корректировать количество и временные рамки введения iRNA на основе наблюдаемых при применении результатов стандартных показателей эффективности, известных из уровня техники или описанных в данном документе.

VI. Способы подавления экспрессии HMGB1

В настоящем изобретении также предусмотрены способы подавления экспрессии гена HMGB1 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, средством на основе двухнитевой РНК, в количестве, эффективном для подавления экспрессии HMGB1 в клетке, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии HMGB1 в клетке.

Приведение клетки в контакт со средством на основе iRNA, например средством на основе двухнитевой РНК, можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение в контакт клетки *in vitro* включает приведение в контакт группы клеток в культуре. Приведение клетки в контакт со средством на основе iRNA *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например субъекта-человека, в контакт со средством на основе iRNA. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение клетки в контакт может быть прямым или опосредованным, как это рассматривалось выше. Более того, приведение клетки в контакт можно выполнять

посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc₃ или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к представляющему интерес сайту.

Термин "подавление", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией", "супрессией" и другими аналогичными терминами, при этом он включает любой уровень подавления.

Подразумевается, что фраза "подавление экспрессии гена HMGB1" относится к подавлению экспрессии любого гена HMGB1 (такого как, например, ген HMGB1 мыши, ген HMGB1 крысы, ген HMGB1 обезьяны или ген HMGB1 человека), а также вариантов или мутантов гена HMGB1. Таким образом, ген HMGB1 может представлять собой ген HMGB1 дикого типа, мутантный ген HMGB1 или трансгенный ген HMGB1 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Подавление экспрессии гена HMGB1" включает любой уровень подавления гена HMGB1, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена HMGB1. Экспрессию гена HMGB1 можно оценивать на основании уровня или изменения уровня любого переменного значения, ассоциированного с экспрессией гена HMGB1, например, уровня mRNA HMGB1 или уровня белка HMGB1. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта. Известно, что HMGB1 экспрессируется в ряде типов тканей в организме, например, в печени, надпочечниках, аппендиксе, костном мозге, головном мозге, толстом кишечнике, эндометрии, пищеводе, жировой ткани, желчном пузыре, сердце, почках, легких, лимфатическом узле, яичниках, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, яичках, щитовидной железе и мочевом пузыре. Можно предположить, что РНК HMGB1, ассоциированная с везикулярными структурами, присутствует в крови, моче и других жидкостях организма. Было показано, что уровень РНК в крови и моче коррелирует с уровнями РНК в печени, (см., например, Sehgal et al., RNA 20:143-149, 2014; Chan et al., Mol. Ther. Nucl. Acids. 4:e263, 2015; оба источника включены в данный документ посредством ссылки). Кроме того, способы подтверждения РНК-интерференции путем обнаружения прогнозированных сайт-специфических продуктов расщепления siRNA известны из уровня техники и использовались для демонстрации расщепления РНК в клинических испытаниях (см., например, Zimmermann et al., Nature. 441:111-114, 2006; Davis et al., Nature. 464:1067-1070, 2010; оба источника включены в данный документ посредством ссылки). Следовательно, уровень нокдауна гена HMGB1 и экспрессии гена в печени может быть больше, чем уровень нокдауна белка HMGB1 в крови или РНК HMGB1, ассоциированной с везикулярными структурами в крови или моче. HMGB1 высвобождается из клеток печени либо активно, либо пассивно за счет выхода из поврежденных клеток во время воспаления печени. Следовательно, снижение HMGB1

после лечения может наблюдаться только по сравнению с более ранним моментом времени у того же индивидуума, например до лечения, или по сравнению с уровнем в заболевшей популяции. Такие обстоятельства хорошо понятны специалистам в данной области техники.

Подавление можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одного или более переменных значений, которые ассоциированы с экспрессией HMGB1, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используют в данной области техники, например, уровень в начальный момент времени до введения дозы или уровень, определенный у сходного субъекта, клетки или образца, не обработанных или обработанных контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена HMGB1 подавляется на по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% или до уровня, который ниже уровня выявления в анализе. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия гена HMGB1 подавляется на по меньшей мере 50%. Понятно, что полное или практически полное подавление HMGB1 может являться нежелательным. Также понятно, что может потребоваться подавление экспрессии HMGB1 в некоторых тканях, например в печени, без значительного подавления экспрессии в других тканях, например в головном мозге. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с использованием способа анализа, представленного в примере 2, с концентрацией siRNA, составляющей 10 нМ, в подходящей клеточной линии соответствующего вида.

В определенных вариантах осуществления подавление экспрессии *in vivo* определяют путем осуществления нокдауна гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, у инфицированной с помощью AAV мыши, экспрессирующей целевой ген человека (т. е. HMGB1), например, при введении однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, при максимальном снижении экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в системе животной модели также можно определить, например, после введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, при максимальном снижении экспрессии РНК. Такие системы применимы в том случае, когда последовательность нуклеиновой кислоты гена человека и гена модельного животного достаточно близки, вследствие чего iRNA человека обеспечивает эффективный нокдаун гена модельного животного. Экспрессию РНК в печени определяют с применением способов на основе ПЦР, представленных в примере 2.

Доказательством подавления экспрессии гена HMGB1 может служить снижение количества mRNA, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген HMGB1 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт с со средством на основе iRNA по

настоящему изобретению или посредством введения средства на основе iRNA по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия HMGB1 подавляется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по сути идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не подвергали такой обработке (контрольная клетка (контрольные клетки), которые не обрабатывали средством на основе iRNA или не обрабатывали средством на основе iRNA, нацеливающейся на представляющий интерес ген). В предпочтительных вариантах осуществления подавление оценивают с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием концентрации siRNA, составляющей 10 нМ, в клеточной линии соответствующего вида, и путем выражения уровня mRNA в обработанных клетках в виде процентной доли от уровня mRNA в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

$$\frac{(\text{mRNA в контрольных клетках}) - (\text{mRNA в обработанных клетках})}{(\text{mRNA в контрольных клетках})} \cdot 100\%$$

В других вариантах осуществления подавление экспрессии гена HMGB1 можно оценивать с точки зрения уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией гена HMGB1, например, уровня белка HMGB1 в крови или сыворотке крови от субъекта, уровня РНК в образце крови или мочи от субъекта. Сайленсинг гена HMGB1 можно определять в любой клетке, которая экспрессирует HMGB1 либо эндогенно, либо гетерологично из конструкции для экспрессии, и с помощью любого анализа, известного из уровня техники.

Доказательством подавления экспрессии белка HMGB1 может служить снижение уровня белка HMGB1, который экспрессируется клеткой или группой клеток в образце субъекта (например, уровня белка в образце крови, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценивания супрессии экспрессии mRNA, подавление уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогично выражать в виде процентной доли уровня белка в контрольной клетке или группе клеток или изменения в уровне белка в образце от субъекта, например, моче, или крови, или сыворотке крови, полученных от него.

Контрольная клетка, группа клеток или образец от субъекта, которые можно использовать для оценки подавления экспрессии гена HMGB1, включают клетку, группу клеток или образец от субъекта, которые еще не приводили в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка, группа клеток или образец от субъекта могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi или от соответственно подходящей контрольной популяции.

Уровень mRNA HMGB1, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять с помощью любого способа оценивания экспрессии mRNA, известного из уровня техники. В одном варианте осуществления уровень экспрессии HMGB1 в образце

определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например, mRNA гена HMGB1. РНК можно экстрагировать из клеток с помощью методик экстрагирования РНК, в том числе, например, экстрагирования с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene™ (PreAnalytix™, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используют гибридизацию рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* гибридизацию и микроматричные анализы.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии HMGB1 определяют с использованием зонда на основе нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин "зонд" относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться со специфическим HMGB1. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды можно специально разрабатывать так, чтобы они содержали метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную mRNA можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения анализы Саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализы с применением матриц с зондами. Один из способов определения уровней mRNA предусматривает приведение выделенной mRNA в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с mRNA HMGB1. В одном варианте осуществления mRNA иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем разгона выделенной mRNA в агарозном геле и переноса mRNA из геля на мембрану, например, нитроцеллюлозную. В альтернативном варианте осуществления зонд(-ы) иммобилизуют на твердой поверхности и mRNA приводят в контакт с зондом(-ами), например, на матрице GeneChip Affymetrix®. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы выявления mRNA для применения в определении уровня mRNA HMGB1.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии HMGB1 в образце предусматривает способ амплификации или обратной транскрипции нуклеиновой кислоты (с получением кДНК), например из mRNA в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в патенте США № 4683202 Mullis, 1987), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты с последующим выявлением амплифицированных молекул с помощью методик, хорошо известных

специалистам в данной области техники. Такие схемы выявления особенно применимы для выявления молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии HMGB1 определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TaqMan™). В определенных вариантах осуществления способы подтверждения РНК-интерференции путем выявления прогнозируемых сайт-специфических продуктов расщепления siRNA известны из уровня техники и использовались для демонстрации расщепления РНК в клинических испытаниях (см., например, Zimmermann et al., *Nature*. 441:111-114, 2006; Davis et al., *Nature*. 464:1067-1070, 2010; оба источника включены в данный документ посредством ссылки). В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием концентрации siRNA, составляющей 10 нМ, в клеточной линии соответствующего вида.

Уровни экспрессии mRNA HMGB1 можно контролировать с помощью мембранного блота (как, например, используемого в гибридизационном анализе, таком как нозерн-, Саузерн-, дот-блот-анализ и т. п.) или микролунок, пробирок для отбора образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии HMGB1 также может предусматривать использование зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии mRNA оценивают с применением анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием концентрации siRNA, составляющей 10 нМ, в клеточной линии соответствующего вида.

Уровень экспрессии белка HMGB1 можно определить с помощью любого способа измерения уровней белка, известного из уровня техники. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т. п.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению оценивают по снижению уровня mRNA HMGB1 или белка (например, при

биопсии печени, крови или мочи).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство на основе iRNA вводят субъекту так, что iRNA доставляется в специфический сайт в организме субъекта. Подавление экспрессии HMGB1 можно оценивать с помощью измерений уровня или изменения уровня mRNA HMGB1 или белка HMGB1 в образце, полученном из жидкости или ткани из специфического сайта в организме субъекта (например, печени, крови, или мочи).

Используемые в данном документе выражения "выявление или определение" уровня аналита следует понимать как означающие выполнение стадий определения в случае присутствия материала, например, белка, РНК. Используемые в данном документе способы выявления или определения включают в себя выявление или определение уровня аналита, который ниже уровня выявления для используемого способа.

VII. Способы предупреждения и лечения нарушений, ассоциированных с HMGB1, с помощью iRNA для HMGB1

В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения средства на основе iRNA по настоящему изобретению или композиции, содержащей iRNA по настоящему изобретению, для подавления экспрессии HMGB1, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение нарушения, ассоциированного с HMGB1, например, метаболического нарушения или NAFLD, например, NASH.

В способах по настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт с siRNA *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с использованием способов по настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген HMGB1, находящуюся, например, в надпочечниках, аппендиксе, костном мозге, головном мозге, толстом кишечнике, эндометрии, пищеводе, жировой ткани, желчном пузыре, сердце, почках, легких, лимфатическом узле, яичниках, предстательной железе, коже, тонком кишечнике, желудке, яичках, щитовидной железе и мочевом пузыре. В предпочтительных вариантах осуществления подходящая клетка представляет собой клетку печени. Клетка, подходящая для применения в способах по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека, в том числе человеческую клетку в химерном животном, не являющемся человеком, или клетка примата, отличного от человека, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе), клетку животного, отличного от примата. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека. Согласно способам по настоящему изобретению экспрессия HMGB1 подавляется в клетке на по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или до уровня, который ниже уровня выявления в анализе. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия HMGB1 подавляется на по меньшей мере 50%. В определенных вариантах осуществления экспрессию определяют в клетке печени. В определенных вариантах осуществления экспрессию РНК

определяют в ассоциированной с везикулами РНК в жидкости организма, например, в крови или моче.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей iRNA, где iRNA включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена HMGB1 млекопитающего, подлежащего введению средства для RNAi. Композицию можно вводить любым путем, известным в данной области техники, в том числе без ограничения пероральным, внутривенным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, через верхние дыхательные пути (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутримышечной инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем ингаляции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. В случае инъекции депо-препарата iRNA может постоянно высвобождаться в течение длительного периода времени. Следовательно, при помощи инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для получения требуемого эффекта, например, требуемого подавления HMGB1, или профилактического или лечебного эффекта. Инъекция депо-препарата также может обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может представлять собой внешний насос или насос, имплантируемый хирургическим путем. В определенных вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой насос для подкожных инфузий. В других вариантах осуществления насос является насосом, имплантируемым хирургическим путем, который доставляет iRNA в печень.

Способ введения можно выбрать исходя из того, требуется ли местное или системное лечение, и исходя из области, подлежащей введению средства на основе iRNA. Путь и место введения можно выбирать для усиления нацеливания.

В одном аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы подавления экспрессии гена HMGB1 у млекопитающего. Способы включают введение

млекопитающему композиции, содержащей dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген HMGB1 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения mRNA-транскрипта гена HMGB1, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена HMGB1 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области техники, и с помощью способов, например qRT-PCR, описанных в данном документе, например, в примере 2. Снижение продуцирования белка можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области техники, например ELISA, и с помощью способов, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления образец, полученный пункционной биопсией печени, служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена или белка HMGB1. В других вариантах осуществления образец крови служит в качестве образца от субъекта для контроля снижения экспрессии белка HMGB1.

В настоящем изобретении дополнительно представлены способы лечения нуждающегося в этом субъекта, например, субъекта с диагнозом метаболического нарушения или NAFLD, например, NASH.

В настоящем изобретении дополнительно представлены способы профилактики у нуждающегося в этом субъекта. Способы лечения по настоящему изобретению включают введение iRNA по настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, у которого снижение экспрессии HMGB1 будет оказывать благоприятное воздействие, в профилактически эффективном количестве iRNA, целенаправленно воздействующей на ген HMGB1, или фармацевтической композиции, содержащей iRNA, целенаправленно воздействующей на ген HMGB1.

iRNA по настоящему изобретению можно вводить в виде "свободной iRNA". Свободную iRNA вводят в отсутствие фармацевтической композиции. "Голая" iRNA может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-буферный солевой раствор (PBS). Значение pH и осмолярность буферного раствора, содержащего iRNA, можно регулировать так, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы iRNA по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав с dsRNA.

Субъекты, у которых подавление экспрессии гена HMGB1 будет оказывать благоприятное воздействие, представляют собой субъектов с риском развития или диагнозом метаболического нарушения или NAFLD, например, NASH или другим состоянием, ассоциированным связанным с NAFL, например, ожирением, сахарным диабетом 2 типа, дислипидемией, поликистозом яичников, гипотиреозом, синдромом обструктивного апноэ во сне, гипопитуитаризмом, гипогонадизмом, панкреатодуоденальной резекцией и псориазом.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции,

представленной в данном документе, с тем, чтобы экспрессия гена-мишени HMGB1 уменьшалась, как, например, на период приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев, приходящийся на дозу.

iRNA, применимые для способов и композиций, представленных в данном документе, предпочтительно осуществляют специфичное целенаправленное воздействие на РНК (первичные или процессированные) гена-мишени HMGB1. Композиции и способы для подавления экспрессии данных генов с использованием iRNA можно получать и осуществлять так, как это описано в данном документе.

Введение iRNA в соответствии со способами по настоящему изобретению может обеспечивать в результате предупреждение или лечение метаболического нарушения или NAFLD, например, NASH. Диагностические критерии метаболического нарушения и различных NAFLD, например NASH, представлены ниже.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг.

iRNA можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени на регулярной основе. В определенных вариантах осуществления после схемы начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Введение iRNA может снижать уровни HMGB1, например, в клетке, ткани, крови или другой части организма пациента на по меньшей мере 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня выявления в используемом способе анализа. Предпочтительно введение iRNA может снижать уровни HMGB1, например, в клетке, ткани, крови или другой части организма пациента на по меньшей мере 50%.

В качестве альтернативы iRNA можно вводить подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. С целью доставки требуемой дозы iRNA субъекту можно использовать одну или более инъекций. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени.

Введение можно повторять на регулярной основе. В определенных вариантах осуществления после схемы начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Схема с повторным введением доз может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. В определенных вариантах осуществления iRNA вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза каждые три месяца или от приблизительно одного раза каждые три месяца до приблизительно одного раза каждые шесть месяцев.

VIII. Характеристики и диагностические критерии метаболического нарушения и NAFLD

A. Метаболический синдром и связанные с ним состояния

Метаболический синдром (синдром X) представляет собой название группы факторов риска, которые встречаются вместе и повышают риск развития заболевания коронарных артерий, инсульта и диабета 2 типа

(www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0004546/). Метаболический синдром подтверждают у индивидуумов по трем или более из следующих признаков, которые являются диагностическими критериями, определенными Американской ассоциацией кардиологов и Национальным институтом сердца, легких и крови:

1. Артериальное давление, равное или превышающее 130/85 мм рт.ст.;
 2. Уровень сахара (глюкозы) в крови натощак, равный или превышающий 100 мг/дл;
 3. Большая окружность талии (длина вокруг талии): у мужчин - 40 дюймов или больше, у женщин - 35 дюймов или больше;
 4. Низкий уровень холестерина HDL: у мужчин - до 40 мг/дл, у женщин - до 50 мг/дл;
- и
5. Уровень триглицеридов, равный или превышающий 150 мг/дл.

Двумя наиболее важными факторами риска возникновения метаболического синдрома являются избыточный вес в средней и верхней частях тела (центральный тип ожирения) и инсулинорезистентность, при которой организм не может эффективно использовать инсулин. У индивидуумов, которые не продуцируют инсулин в достаточном количестве или не отвечают на уровень продуцируемого инсулина, возрастают уровни сахара в крови и жира. Другие факторы риска возникновения метаболического синдрома включают старение, генетические факторы, гормональные изменения и малоподвижный образ жизни. Люди с метаболическим синдромом часто страдают как от одного, так и от обоих из повышенного свертывания крови и низких уровней системного воспаления, которые оба могут усугубить состояние. Помимо наличия повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в долгосрочной перспективе и диабета 2 типа, осложнения метаболического синдрома дополнительно включают атеросклероз, сердечный приступ, заболевание почек, неалкогольную жировую болезнь печени, заболевание периферических артерий и инсульт, а также осложнения, обычно ассоциированные с диабетом.

Хотя метаболический синдром формально определяется пятью критериями, приведенными выше, метаболические нарушения можно определить по другим показателям. Например, об инсулинорезистентности или преддиабете могут свидетельствовать повышенные уровни глюкозы в крови натощак, составляющие по меньшей мере 100 мг/дл, глюкозы в крови через 2 часа после приема пищи или глюкозы в сыворотке крови, составляющие по меньшей мере 140 мг/дл. Диагностическими критериями сахарного диабета 2 типа являются любые из следующего: уровень гемоглобина A1c (HbA1c), составляющий 6,5% или выше; уровень глюкозы в крови натощак, составляющий по меньшей мере 126 мг/дл; концентрация глюкозы в крови или сыворотке крови через 2 часа после приема пищи, составляющая по меньшей мере 200 мг/дл; или концентрация глюкозы в плазме крови в случайном тесте, составляющая по меньшей мере 200 мг/дл, у пациента с классическими симптомами гипергликемии (т. е. с полиурией, полидипсией, полифагией, потерей веса) или гипергликемическим кризом.

Ожирение (повышенный индекс массы тела [BMI] и висцеральное ожирение)

является наиболее распространенным и научно доказанным фактором риска для NAFLD. Фактически весь спектр ожирения находится в диапазоне от избыточного веса (BMI от 25,0 до < 30) до ожирения (BMI > 30) и тяжелого ожирения (класс 1: BMI от 30 до < 35; класс 2: от 35 до < 40; класс 3: > 40).

Гипертензия, высокое кровяное давление, может быть определена степенями тяжести, при этом гипертензия 1 стадии представляет собой систолическое давление в диапазоне от 140 до 159 мм рт. ст. или диастолическое давление в диапазоне от 90 до 99 мм рт.ст. Более тяжелая гипертензия, гипертензия 2 стадии, представляет собой систолическое давление 160 мм рт.ст. или выше или диастолическое давление 100 мм рт.ст. или выше.

Аналогично считается, что гиперхолестеринемия имеет различные степени тяжести исходя из уровней. Для холестерина LDL уровень от 130 до 159 мг/дл считается гранично высоким; от 160 до 189 мг/дл считается высоким; а более 190 мг/дл считается очень высоким. Для общего холестерина уровень от 200 до 239 мг/дл считается гранично высоким, а более 240 мг/дл считается высоким. Для холестерина HDL уровень менее 40 мг/дл считается слишком низким.

Лечение метаболического синдрома и связанных с ним нарушений включает изменения образа жизни или прием лекарственных препаратов, помогающих снизить кровяное давление, уровень холестерина LDL и сахара в крови, например, потеря веса, увеличение физической нагрузки. Кровяное давление и уровень холестерина также можно регулировать с помощью соответствующих лекарственных средств.

B. NAFLD

NAFLD официально определяется (1) признаками стеатоза печени (HS) согласно визуализации или гистологическому исследованию и (2) отсутствием вторичных причин накопления жира в печени, таких как значительное употребление алкоголя, длительное использование стеатогенного лекарственного препарата или моногенные наследственные нарушения (Chalasani et al., 2017. *Hepatology*. DOI: 10.1002/hep.29367, включен в данный документ посредством ссылки). Предполагается, что NAFLD охватывает весь спектр заболеваний, связанных с жировой инфильтрацией печени, у индивидуумов, не употребляющих алкоголь в значительном количестве, включая, например, жировое перерождение печени, стеатогепатит и цирроз печени.

Считается, что NAFL включает наличие по меньшей мере 5% HS без признаков гепатоцеллюлярного повреждения в форме баллонной дистрофии гепатоцитов или признаков фиброза. Как правило, считается, что риск прогрессирования цирроза и развития печеночной недостаточности минимален.

Считается, что NASH включает наличие по меньшей мере 5% HS с воспалением и повреждением гепатоцитов (баллонной дистрофией) с фиброзом или без него. NASH может прогрессировать до цирроза, печеночной недостаточности, а иногда перерождаться в рак печени.

Для определения степени NAFLD известны как невзвешенные, так и полуколичественные методы балльных оценок. Показатель активности NAFLD (NAS),

разработанный Сетью клинических исследований NASH, представляет собой невзвешенное сочетание балльных показателей стеатоза, лобулярного воспаления и баллонной дистрофии. Теоретически NAS является полезным инструментом для измерения изменений в гистологии печени у пациентов с NAFLD в клинических испытаниях, но стоимость и риски для исследования субъектов с периодической биопсией печени делают систему оценки менее практичной для мониторинга. Фиброз оценивают в баллах отдельно (Kleiner et al., 2005. *Hepatology*. 41:1313-1321, также см. tpis.upmc.com/changebody.cfm?url=/tpis/schema/NAFLD2006.jsp, при этом оба источника включены посредством ссылки).

Показатель в баллах Стеатоз-Активность-Фиброз (SAF), разработанный Европейским консорциумом по ограничению прогрессирования жирового перерождения печени, представляет собой полуколичественный показатель, состоящий из степени стеатоза, его активности (лобулярное воспаление и баллонная дистрофия) и фиброза (Bedossa, 2014. *Hepatology*, 60:565-575, включен в данный документ посредством ссылки). Появляется все больше число доказательств того, что пациенты с гистологически подтвержденным NASH, особенно те, у кого имеется некоторая степень фиброза, подвергаются более высокому риску неблагоприятных исходов, таких как цирроз печени и смертность, связанная с патологией печени, поэтому включение фиброза в оценку может быть полезным. Типами фиброза печени, наиболее тесно ассоциированными со смертностью в отдаленном периоде, являются от синусоидального фиброза 3 зоны ацинуса с перипортальным фиброзом (стадия 2) до прогрессирующего мостовидного фиброза (стадия 3) или цирроза (стадия 4). Однако, как и в случае с NAS, необходимость проведения биопсии печени делает метод балльной оценки более применимым для подтверждения диагноза, а не для мониторинга.

У большинства пациентов NAFLD ассоциирована с сопутствующими метаболическими заболеваниями, такими как ожирение, сахарный диабет и дислипидемия. NAFLD также может быть ассоциирована с поликистозом яичников, гипотиреозом, синдромом обструктивного апноэ во сне, гипопитуитаризмом, гипогонадизмом, панкреатодуоденальной резекцией и псориазом. Хотя окончательный диагноз NAFLD требует гистологического подтверждения, при том, что специфическое лечение NAFLD отсутствует и проведение биопсии печени является дорогостоящим, он несет риск для пациента и может стать объектом ошибки при отборе образцов из-за потенциальной неоднородности гистологической структуры всей печени. Следовательно, проведение биопсии печени требуется лишь для тех пациентов, кто может получить пользу от скрининга, путем включения или исключения NAFLD в качестве диагноза и предоставления информации о степени тяжести заболевания. Скрининг общей популяции пациентов с помощью биопсии печени в качестве стандарта не рекомендуется.

Наличие метаболического синдрома является надежным прогностическим фактором наличия SH у пациентов с NAFLD. Хотя NAFLD тесно ассоциирована с компонентами метаболического синдрома, наличие возрастающего числа метаболических заболеваний,

таких как инсулинорезистентность, диабет 2 типа, дислипидемия, гипертензия и висцеральное ожирение, по-видимому, увеличивает риск прогрессирования заболевания печени. Следовательно, пациенты с NAFLD и множеством факторов риска, таких как сахарный диабет 2 типа и гипертензия, подвержены наибольшему риску неблагоприятных исходов.

Известны неинвазивные методы оценки SH и фиброза, но такие методы имеют свои ограничения. Уровни аминотрансферазы в сыворотке крови и процедуры диагностической визуализации, такие как ультразвуковое исследование, в том числе транзиентная эластография (TE), компьютерная томография (СТ) и магнитно-резонансная томография (MRI), достоверно не отражают спектр гистологических изменений в печени у пациентов с NAFLD. Несмотря на такие ограничения, MRI либо с помощью спектроскопии, либо с помощью определения протонной плотности жировой фракции, является отличным неинвазивным методом количественного определения HS и широко используется в клинических испытаниях NAFLD. Использование TE для получения параметров непрерывной аттенуации является перспективным средством для количественного определения печеночного жира в амбулаторных условиях. Однако полезность неинвазивного количественного определения HS у пациентов с NAFLD в стандартной клинической практике ограничена.

Существовал значительный интерес к разработке правил клинического прогнозирования и неинвазивных биомаркеров для идентификации SH у пациентов с NAFLD. Уровни циркулирующих фрагментов цитокератина-18 были тщательно исследованы в качестве новых биомаркеров наличия SH у пациентов с NAFLD. В условиях клинической практики данный тест в настоящее время недоступен. Неинвазивные средства, стандартно проводимые для выявления прогрессирующего фиброза при NAFLD, включают соотношение аспартатаминотрансферазы (AST) и индекса тромбоцитов (APRI) и сывороточные биомаркеры (тестовая панель повышенный фиброз печени [ELF]). Однако до настоящего времени не было найдено методик анализа или биомаркеров, полностью удовлетворяющих все критерии (Musso et al., 2011. Ann. Med. 43:617-649).

С. Цирроз

Цирроз определяют по результатам гистологического анализа как диффузный печеночный процесс, характеризующийся фиброзом и превращением нормальной архитектуры печени в структурно аномальные узлы. Прогрессирование повреждения печени до цирроза может происходить в течение недель или лет. Цирроз может возникать из-за ряда нарушений, включая аутоиммунный гепатит, вирусный гепатит (например, гепатит В или С), гемохроматоз, первичный билиарный цирроз или длительное или чрезмерное употребление алкоголя или других лекарственных средств, которые могут вызвать повреждение печени.

Цирроз может иметь бессимптомное течение или сопровождаться множеством симптомов и заканчиваться терминальной стадией заболевания печени. Общие признаки и симптомы могут быть вызваны снижением синтетической функции печени (например,

коагулопатия), портальной гипертензией (например, кровотечение из варикозно расширенных сосудов) или снижением детоксикационной способности печени (например, печеночная энцефалопатия). Пациенты с циррозом печени испытывают усталость, анорексию, потерю веса и истощение мышечной ткани. Кожные проявления цирроза включают желтуху, сосудистые звездочки, телеангиэктазии на коже ("кожа в виде бумажных денег"), ладонную эритему, белые ногти, исчезновение ногтевой луночки и утолщение концевых фаланг пальцев, особенно в условиях гепатопульмонального синдрома. Мониторинг фиброза печени можно проводить при помощи способов, предназначенных для мониторинга NAFLD, описанных выше.

Лечение цирроза зависит от основной этиологии заболевания.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Полное содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых в данной заявке, а также перечня последовательностей таким образом включено в данный документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез iRNA

Источники реагентов

Если источник реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Конструирование siRNA

Набор siRNA, целенаправленно воздействующих на ген белка бокса 1 высокомолекулярной группы человека (HMGB1; ID эталонной последовательности человека в NCBI: NM_002128.5; NCBI GeneID: 3146), а также на ортологи HMGB1 с фрагментом, обуславливающим токсичность (яванский макак: NM_001283356), конструировали с помощью специально разработанных скриптов на языках R и Python. Все конструкции siRNA характеризуется идеальным совпадением с транскриптом HMGB1 человека, и подгруппа характеризуется либо идеальным, либо практически идеальным совпадением с ортологом яванского макака. Длина эталонной последовательности версии 5 mRNA NM_002128 человека составляет 4273 основания.

Подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для HMGB1 показан в таблице 3. Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей HMGB1 показан в таблицах 5, 6 и 7.

Синтез siRNA

siRNA синтезировали и гибридизировали с помощью стандартных способов, известных в данной области техники.

Пример 2 - способы скрининга *in vitro*:

Культура клеток и трансфекции:

клетки Hep3b (ATCC) трансфицировали путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку, при этом каждый дуплекс siRNA был в 4 параллелях, в 384-луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем сорок мкл минимальной поддерживающей среды Игла (Life Tech), содержащей $\sim 5 \times 10^3$ клеток добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с введением однократной дозы проводили при 10 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора DYNABEADS mRNA Isolation Kit:

РНК выделяли при помощи протокола для автоматизированной платформы BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, № кат. 61012). Вкратце 70 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных гранул, вносили в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы фиксировали и удаляли супернатант. Связанную с гранулой РНК затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и один раз промывочным буфером В. Затем гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно фиксировали и удаляли супернатант.

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

Десять мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл 10х случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O на реакцию, добавляли к РНК, выделенной выше. Планшеты запечатывали, встряхивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре и в течение дополнительных 2 ч при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (4326317E) и 0,5 мкл HMGB1 человека с зондом (Hs.PT.58.2259017, IDT) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени осуществляли в системе LightCycler480 Real Time PCR (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза и данные нормализовали относительно клеток, трансфицированных с помощью нецелевой контрольной siRNA. 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 нецелевой контрольной siRNA.

Таблица 2. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты, если указаны модификации. Следует понимать, что если не указано иное, данные мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, связаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3`-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3`-фосфотиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3`-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3`-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3`-фосфотиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	Любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил)]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3
Y34	2-Гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (с 2'-ОМе-фуранозой с удаленным азотистым основанием)
Y44	Инвертированный нуклеотид ДНК с удаленным азотистым основанием (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	Аденозин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	Цитидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	Гуанозин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидин-гликоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
P	Фосфат
VP	Винилфосфат
(Aam)	2'-O-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-O-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфотиоат
(Gam)	2'-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфотиоат
(Tam)	2'-O-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-O-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфотиоат
dA	2'-дезоксияденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксияденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфотиоат
(Aeo)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-O-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-O-метилксилофуранозиладенозин-2'-фосфат

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
(G3m)	3'-О-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-метилксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-метилксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
U3mx)	3'-О-метилксилофуранозилуридин-2'-фосфат
(m5Cam)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфотиоат
(pshe)	гидроксиэтилфосфотиоат

Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для HMGB1

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5
AD-192647	A-380909	GUGCAAACUUGUCGGGAGGAA	17	242-262	A-380910	UUCCUCCCGACAAGUUUGCACAA	111	240-262
AD-193168	A-381951	UUUUUAAACUGUACAGUGUCU	18	944-964	A-381952	AGACACUGUACAGUUUAAAAACA	112	942-964
AD-193173	A-381961	UUUGUAUAGUUAACACACUAA	19	968-988	A-381962	UUAGUGUGUUAACUAUACAAAAA	113	966-988
AD-193174	A-381963	UUGUAUAGUUAACACACUACA	20	969-989	A-381964	UGUAGUGUGUUAACUAUACAAAA	114	967-989
AD-193175	A-381965	UGUAUAGUUAACACACUACCA	21	970-990	A-381966	UGGUAGUGUGUUAACUAUACAAA	115	968-990
AD-193176	A-381967	GUUAUAGUUAACACACUACCGA	22	971-991	A-381968	UCGGUAGUGUGUUAACUAUACAA	116	969-991
AD-193177	A-381969	UAUAGUUAACACACUACCGAA	23	972-992	A-381970	UUCGGUAGUGUGUUAACUAUACA	117	970-992
AD-193178	A-381971	AUAGUUAACACACUACCGAAU	24	973-993	A-381972	AUUCGGUAGUGUGUUAACUAUAC	118	971-993
AD-193179	A-381973	UAGUUAACACACUACCGAAUA	25	974-994	A-381974	UAUUCGGUAGUGUGUUAACUAUA	119	972-994
AD-193180	A-381975	AGUUAACACACUACCGAAUGU	26	975-995	A-381976	ACAUUCGGUAGUGUGUUAACUAU	120	973-995
AD-193181	A-381977	GUUAACACACUACCGAAUGUA	27	976-996	A-381978	UACAUUCGGUAGUGUGUUAACUA	121	974-996
AD-193182	A-381979	UUAACACACUACCGAAUGUGU	28	977-997	A-381980	ACACAUUCGGUAGUGUGUUAACU	122	975-997
AD-193311	A-382236	UCUCUGAUGCAGCUUAUACGA	29	1158-1178	A-382237	UCGUUAUAGCUGCAUCAGAGACA	123	1156-1178
AD-193312	A-382238	CUCUGAUGCAGCUUAUACGAA	30	1159-1179	A-382239	UUCGUUAUAGCUGCAUCAGAGAC	124	1157-1179
AD-193313	A-382240	UCUGAUGCAGCUUAUACGAAA	31	1160-1180	A-382241	UUUCGUUAUAGCUGCAUCAGAGA	125	1158-1180
AD-193314	A-382242	CUGAUGCAGCUUAUACGAAAU	32	1161-1181	A-382243	AUUUCGUUAUAGCUGCAUCAGAG	126	1159-1181
AD-193315	A-382244	UGAUGCAGCUUAUACGAAUA	33	1162-1182	A-382245	UAUUUCGUUAUAGCUGCAUCAGA	127	1160-1182
AD-193326	A-382266	UACGAAAUAAUUGUUGUUCUA	34	1174-1194	A-382267	UAGAACAAACAAUUAUUUCGUUA	128	1172-1194
AD-193400	A-382413	UUGUUGUCCUUUUCUAGGUA	35	1298-1318	A-382414	UACCUAUGAAAAGGACAACAUA	129	1296-1318
AD-193422	A-382457	GGGAAGCUAGUCUUUUGCUUU	36	1338-1358	A-382458	AAAGCAAAAGACUAGCUUCCCU	130	1336-1358

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5
AD-193478	A-382569	AUCCUUUCAUAUAGUUAGCUA	37	1395-1415	A-382570	UAGCUAACUAUAUGAAAGGAUAA	131	1393-1415
AD-193479	A-382571	UCCUUUCAUAUAGUUAGCUAA	38	1396-1416	A-382572	UUAGCUAACUAUAUGAAAGGAUA	132	1394-1416
AD-193498	A-382609	AAAAAGCUUUUGUCUACACAA	39	1418-1438	A-382610	UUGUGUAGACAAAAGCUUUUUUAU	133	1416-1438
AD-193506	A-382625	UUUGUCUACACACCCUGCAUA	40	1426-1446	A-382626	UAUGCAGGGUGUGUAGACAAAAG	134	1424-1446
AD-193507	A-382627	UUGUCUACACACCCUGCAUAU	41	1427-1447	A-382628	AUAUGCAGGGUGUGUAGACAAAA	135	1425-1447
AD-193522	A-382657	AAGUUAAGUUGAGAUAGUUUU	42	1461-1481	A-382658	AAAACUAUCUCAACUUAACUUUA	136	1459-1481
AD-193524	A-382661	GUUAAGUUGAGAUAGUUUUA	43	1463-1483	A-382662	UGAAAACUAUCUCAACUUAACUU	137	1461-1483
AD-193527	A-382667	AAGUUGAGAUAGUUUUCAUCA	44	1466-1486	A-382668	UGAUGAAAACUAUCUCAACUUA	138	1464-1486
AD-193533	A-382679	AGAUAGUUUUCAUCCAUAACU	45	1472-1492	A-382680	AGUUAUGGAUGAAAACUAUCUCA	139	1470-1492
AD-193534	A-382681	GAUAGUUUUCAUCCAUAACUA	46	1473-1493	A-382682	UAGUUAUGGAUGAAAACUAUCUC	140	1471-1493
AD-193535	A-382683	AUAGUUUUCAUCCAUAACUGA	47	1474-1494	A-382684	UCAGUUAUGGAUGAAAACUAUCU	141	1472-1494
AD-193562	A-382737	AAAUCUUGAUCAGUUAAGAA	48	1501-1521	A-382738	UUCUUAACUGAUCAGAUUUUUGG	142	1499-1521
AD-193577	A-382767	UAAGAAAUUUCACAUAGCCCA	49	1516-1536	A-382768	UGGGCUAUGUGAAAUUUCUUAAC	143	1514-1536
AD-193585	A-382783	UUCACAUAGCCCACUUAACUU	50	1524-1544	A-382784	AAUGUAAGUGGGCUAUGUGAAAU	144	1522-1544
AD-193586	A-382785	UCACAUAGCCCACUUAACUUU	51	1525-1545	A-382786	AAAUGUAAGUGGGCUAUGUGAAA	145	1523-1545
AD-193587	A-382787	CACAUAGCCCACUUAACUUUA	52	1526-1546	A-382788	UAAAUGUAAGUGGGCUAUGUGAA	146	1524-1546
AD-193589	A-382791	CAUAGCCCACUUAACUUUACA	53	1528-1548	A-382792	UGUAAAUGUAAGUGGGCUAUGUG	147	1526-1548
AD-193592	A-382797	AGCCCACUUAACUUUACAAAC	54	1531-1551	A-382798	GUUUGUAAAUGUAAGUGGGCUAU	148	1529-1551
AD-193625	A-382863	AAUCUACUCAAAGCAUGGGAU	55	1564-1584	A-382864	AUCCCAUGCUUUGAGUAGAUUGA	149	1562-1584
AD-193629	A-382871	UACUCAAGCAUGGGAUUAUU	56	1568-1588	A-382872	AAUAAUCCCAUGCUUUGAGUAGA	150	1566-1588
AD-193630	A-382873	ACUCAAGCAUGGGAUUAUUA	57	1569-1589	A-382874	UAAUAAUCCCAUGCUUUGAGUAG	151	1567-1589

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5
AD-193633	A-382879	CAAAGCAUGGGAUUUAUAGAA	58	1572-1592	A-382880	UUCUAAUAAUCCCAUGCUUUGAG	152	1570-1592
AD-193635	A-382883	AAGCAUGGGAUUUAUAGAAUA	59	1574-1594	A-382884	UAUUCUAAUAAUCCCAUGCUUUG	153	1572-1594
AD-193640	A-382893	UGGGAUUUAUAGAAUCAAACA	60	1579-1599	A-382894	UGUUUGAUUCUAAUAAUCCCAUG	154	1577-1599
AD-193662	A-382937	AAAGUCUGUCCUUGAAGGACU	61	1605-1625	A-382938	AGUCCUUAAGGACAGACUUUCA	155	1603-1625
AD-193666	A-382945	UCUGUCCUUGAAGGACUAAUA	62	1609-1629	A-382946	UAUUAGUCCUUAAGGACAGACU	156	1607-1629
AD-193667	A-382947	CUGUCCUUGAAGGACUAAUAA	63	1610-1630	A-382948	UUUUUAGUCCUUAAGGACAGAC	157	1608-1630
AD-193669	A-382951	GUCCUUGAAGGACUAAUAGAA	64	1612-1632	A-382952	UUCUAAUAGUCCUUAAGGACAG	158	1610-1632
AD-193690	A-382993	AAGUAUGUUCUAACCUUUACA	65	1633-1653	A-382994	UGUAAAGGUUAGAACAUCUUUU	159	1631-1653
AD-193697	A-383007	UUCUAACCUUUACAUGAGGAA	66	1640-1660	A-383008	UUCCUCAUGUAAAGGUUAGAACA	160	1638-1660
AD-193702	A-383017	ACCUUUACAUGAGGACUCUAU	67	1645-1665	A-383018	AUAGAGUCCUCAUGUAAAGGUUA	161	1643-1665
AD-193705	A-383023	UUUACAUGAGGACUCUAUUCU	68	1648-1668	A-383024	AGAAUAGAGUCCUCAUGUAAAGG	162	1646-1668
AD-193706	A-383025	UUACAUGAGGACUCUAUUCUU	69	1649-1669	A-383026	AAGAAUAGAGUCCUCAUGUAAAG	163	1647-1669
AD-193707	A-383027	UACAUGAGGACUCUAUUCUUU	70	1650-1670	A-383028	AAAGAAUAGAGUCCUCAUGUAAA	164	1648-1670
AD-193711	A-383035	UGAGGACUCUAUUCUUUAACU	71	1654-1674	A-383036	AGUUAAGAAUAGAGUCCUCAUG	165	1652-1674
AD-193713	A-383039	AGGACUCUAUUCUUUAACUCA	72	1656-1676	A-383040	UGAGUUAAGAAUAGAGUCCUCA	166	1654-1676
AD-193717	A-383047	CUCUAUUCUUUAACUCCCAUU	73	1660-1680	A-383048	AAUGGGAGUUAAGAAUAGAGUC	167	1658-1680
AD-193725	A-383063	UUUAACUCCCAUUACCAUGUA	74	1668-1688	A-383064	UACAUGGUAAUGGGAGUUAAGA	168	1666-1688
AD-193726	A-383065	UUAACUCCCAUUACCAUGUAA	75	1669-1689	A-383066	UUACAUGGUAAUGGGAGUUAAG	169	1667-1689
AD-193727	A-383067	UAACUCCCAUUACCAUGUAAU	76	1670-1690	A-383068	AUUACAUGGUAAUGGGAGUUA	170	1668-1690
AD-193729	A-383071	ACUCCCAUUACCAUGUAAUGA	77	1672-1692	A-383072	UCAUUACAUGGUAAUGGGAGUUA	171	1670-1692
AD-193731	A-383075	UCCCAUUACCAUGUAAUGGCA	78	1674-1694	A-383076	UGCCAUUACAUGGUAAUGGGAGU	172	1672-1694

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5
AD-193737	A-383087	UACCAUGUAAUGGCAGUUAUA	79	1680-1700	A-383088	UAUAACUGCCAUUACAUGGUAAU	173	1678-1700
AD-193744	A-383101	UAAUGGCAGUUAUAUUUUGCA	80	1687-1707	A-383102	UGCAAAAUUAACUGCCAUUACA	174	1685-1707
AD-193782	A-383177	AAAGCGUGAGCUUAAAAUACA	81	1745-1765	A-383178	UGUAUUUUUAAGCUCACGCUUUUG	175	1743-1765
AD-193783	A-383179	AAGCGUGAGCUUAAAAUACAA	82	1746-1766	A-383180	UUGUAUUUUUAAGCUCACGCUUUU	176	1744-1766
AD-193804	A-383221	UUUGUUGACAUUAGUCUCAGU	83	1785-1805	A-383222	ACUGAGACUAAUGUCAACAAAAA	177	1783-1805
AD-193805	A-383223	UUGUUGACAUUAGUCUCAGUA	84	1786-1806	A-383224	UACUGAGACUAAUGUCAACAAAA	178	1784-1806
AD-193833	A-383279	UGAAAAUGCUGGCUAUAGAUUA	85	1814-1834	A-383280	UAUCUAUAGCCAGCAUUUUCAUA	179	1812-1834
AD-193841	A-383295	CUGGCUAUAGAUGUCUUUUA	86	1822-1842	A-383296	UGAAAAGACAUCUAUAGCCAGCA	180	1820-1842
AD-193870	A-383353	UAAAUUUGGACUGCUCAGGAA	87	1851-1871	A-383354	UUCCUGAGCAGUCCAUAUUUAGA	181	1849-1871
AD-193875	A-383363	AUGGACUGCUCAGGAAACGAA	88	1856-1876	A-383364	UUCGUUCCUGAGCAGUCCAUAU	182	1854-1876
AD-193877	A-383367	GGACUGCUCAGGAAACGAGAA	89	1858-1878	A-383368	UUCUGGUUCCUGAGCAGUCCAUAU	183	1856-1878
AD-193881	A-383375	UGCUCAGGAAACGAGACUUUA	90	1862-1882	A-383376	UAAAGUCUCGUUCCUGAGCAGU	184	1860-1882
AD-193887	A-383387	GGAAACGAGACUUUCCAUAUA	91	1868-1888	A-383388	UUAAUGGAAAGUCUCGUUCCUG	185	1866-1888
AD-193888	A-383389	GAAACGAGACUUUCCAUAUA	92	1869-1889	A-383390	UGUAAUGGAAAGUCUCGUUCCU	186	1867-1889
AD-193905	A-383423	UUUAAUUAAUUGGGCCAGCUU	93	1896-1916	A-383424	AAGCUGGCCCAAUUAUUAAAAA	187	1894-1916
AD-193907	A-383427	UAAUUAAUUGGGCCAGCUUUU	94	1898-1918	A-383428	AAAAGCUGGCCCAAUUAUUAAA	188	1896-1918
AD-194087	A-383787	GGUUUUCGAGAUUAUCGUUUU	95	2131-2151	A-383788	AAAACGAUAAUCUCGAAAACCAC	189	2129-2151
AD-194088	A-383789	GUUUUCGAGAUUAUCGUUUUA	96	2132-2152	A-383790	UAAAACGAUAAUCUCGAAAACCA	190	2130-2152
AD-194089	A-383791	UUUUCGAGAUUAUCGUUUUCU	97	2133-2153	A-383792	AGAAAACGAUAAUCUCGAAAACC	191	2131-2153
AD-194090	A-383793	UUUCGAGAUUAUCGUUUUCUU	98	2134-2154	A-383794	AAGAAAACGAUAAUCUCGAAAAC	192	2132-2154
AD-194120	A-383853	GUAUUUUAAAAUAGCGUUCUU	99	2164-2184	A-383854	AAGAACGCUAUUUUAAAAUACUG	193	2162-2184

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Положение в NM_002128.5
AD-194134	A-383881	CGUUCUUGUAAUUUUACACGA	100	2178-2198	A-383882	UCGUGUAAAAUUACAAGAACGCU	194	2176-2198
AD-194135	A-383883	GUUCUUGUAAUUUUACACGCU	101	2179-2199	A-383884	AGCGUGUAAAAUUACAAGAACGC	195	2177-2199
AD-194136	A-383885	UUCUUGUAAUUUUACACGCUU	102	2180-2200	A-383886	AAGCGUGUAAAAUUACAAGAACG	196	2178-2200
AD-194137	A-383887	UCUUGUAAUUUUACACGCUUU	103	2181-2201	A-383888	AAAGCGUGUAAAAUUACAAGAAC	197	2179-2201
AD-194140	A-383893	UGUAAUUUUACACGCUUUUGU	104	2184-2204	A-383894	ACAAAAGCGUGUAAAAUUACAAG	198	2182-2204
AD-194163	A-383939	UGGAGUGCUGUUUUGUUAUUAU	105	2207-2227	A-383940	AUAUAACAAAACAGCACUCCAUC	199	2205-2227
AD-194218	A-384049	AGGAGGAAUACUGAACAUUA	106	2274-2294	A-384050	UAGAUGUUCAGUAUUCUCCUGA	200	2272-2294
AD-194234	A-384081	AUCUGAGUCCUGGAUGAUACU	107	2290-2310	A-384082	AGUAUCAUCCAGGACUCAGAUGU	201	2288-2310
AD-194238	A-384089	GAGUCCUGGAUGAUACUAAUA	108	2294-2314	A-384090	UAUUAGUAUCAUCCAGGACUCAG	202	2292-2314
AD-194239	A-384091	AGUCCUGGAUGAUACUAAUAA	109	2295-2315	A-384092	UUUUUAGUAUCAUCCAGGACUCA	203	2293-2315
AD-194240	A-384093	GUCCUGGAUGAUACUAAUAAA	110	2296-2316	A-384094	UUUAUUAGUAUCAUCCAGGACUC	204	2294-2316

Таблица 4. Скрининг с однократной дозой 10 нМ HMGB1 в клетках Нер3В

Название дуплекса	% остаточной матричной РНК	СТАНД. ОТКЛОН.
AD-192647	81,57	3,56
AD-193168	20,43	2,54
AD-193173	24,09	1,23
AD-193174	26,53	3,25
AD-193175	27,90	4,30
AD-193176	34,01	6,20
AD-193177	15,73	2,06
AD-193178	26,24	4,01
AD-193179	25,73	9,39
AD-193180	21,18	2,01
AD-193181	38,63	7,53
AD-193182	21,56	5,17
AD-193311	25,70	4,33
AD-193312	18,47	3,13
AD-193313	20,82	10,27
AD-193314	22,41	5,21
AD-193315	27,80	8,56
AD-193326	29,11	7,73
AD-193400	82,08	4,18
AD-193422	79,51	7,23
AD-193478	79,52	8,18
AD-193479	70,42	3,83
AD-193498	83,25	2,42
AD-193506	80,09	6,36
AD-193507	66,94	6,17
AD-193522	74,92	4,81
AD-193524	79,70	0,98
AD-193527	74,59	4,47
AD-193533	74,98	2,84
AD-193534	82,24	7,32
AD-193535	90,81	17,72
AD-193562	69,12	4,29
AD-193577	82,35	9,79
AD-193585	69,16	7,65
AD-193586	84,34	8,42
AD-193587	73,06	2,96

AD-193589	68,30	0,31
AD-193592	71,65	9,71
AD-193625	85,01	3,19
AD-193629	75,42	6,58
AD-193630	70,89	3,30
AD-193633	76,98	1,12
AD-193635	73,79	8,93
AD-193640	83,67	10,30
AD-193662	79,32	2,93
AD-193666	69,14	3,47
AD-193667	71,79	4,27
AD-193669	74,43	6,47
AD-193690	82,84	3,36
AD-193697	95,48	14,41
AD-193702	99,68	11,04
AD-193705	65,56	5,34
AD-193706	92,00	13,15
AD-193707	62,04	4,15
AD-193711	62,39	4,64
AD-193713	65,37	3,62
AD-193717	85,08	8,81
AD-193725	120,19	10,38
AD-193726	114,41	11,32
AD-193727	87,63	6,87
AD-193729	94,59	11,02
AD-193731	97,95	9,65
AD-193737	84,99	8,68
AD-193744	78,18	5,00
AD-193782	69,62	5,67
AD-193783	81,44	7,84
AD-193804	54,01	2,50
AD-193805	78,66	9,48
AD-193833	81,66	5,79
AD-193841	87,16	16,71
AD-193870	85,76	3,40
AD-193875	86,06	16,09
AD-193877	79,32	3,03
AD-193881	100,68	12,73
AD-193887	84,55	12,29

AD-193888	76,99	10,96
AD-193905	74,52	2,74
AD-193907	86,49	6,58
AD-194087	86,44	13,74
AD-194088	74,32	13,04
AD-194089	86,18	21,81
AD-194090	92,04	16,15
AD-194120	84,68	18,31
AD-194134	63,14	9,93
AD-194135	80,83	2,56
AD-194136	75,00	9,48
AD-194137	74,80	8,75
AD-194140	79,80	8,97
AD-194163	71,16	5,21
AD-194218	80,36	8,98
AD-194234	70,23	0,72
AD-194238	65,81	15,61
AD-194239	75,27	10,77
AD-194240	67,08	6,69

Таблица 5. Модифицированные последовательности HMGB1

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мПНК в NM_002128.5	SEQ ID NO
AD-193326	A-382266	usascgaaAfuAfAfUfuguuguucuaL96	205	A-382267	usAfsгааCfaAfCfaauuAfuUfucguasusa	299	UAUACGAAUAAUUGUUGUUCUG	393
AD-193478	A-382569	asusccuuUfcAfUfAfuauguagcuaL96	206	A-382570	usAfsгcuAfaCfUfauauGfaAfaggasasa	300	UUAUCCUUUCAUUAUAGUUAGCUA	394
AD-193587	A-382787	csascauaGfcCfCfAfcuuaauuaL96	207	A-382788	usAfsaauGfuAfAfguggGfcUfaugugsasa	301	UUCACAUAGCCCACUUAUUA	395
AD-194240	A-384093	gsusccugGfaUfGfAfuacuaauaaaL96	208	A-384094	usUfsuauUfaGfUfaucaUfcCfaggacsusc	302	GAGUCCUGGAUGAUACUAAUAAA	396
AD-193585	A-382783	ususcacaUfaGfCfCfcacuuacauuL96	209	A-382784	asAfsuguAfaGfUfgggcUfaUfgugaasasu	303	AUUUCACAUAGCCCACUUAUUA	397
AD-193589	A-382791	csasuagcCfcAfCfUfuacuuuacalL96	210	A-382792	usGfsuuaAfuGfUfaaguGfgGfcuaugsusg	304	CACAUAGCCCACUUAUUAUACA	398
AD-193707	A-383027	usascaugAfgGfAfCfucuaauucuuL96	211	A-383028	asAfsagaAfuAfGfagucCfuCfauguasasa	305	UUUACAUGAGGACUCUAUUCUUU	399
AD-193711	A-383035	usgsaggaCfuCfUfAfuucuuuaacuL96	212	A-383036	asGfsuuaAfaGfAfaugAfgUfccucasusg	306	CAUGAGGACUCUAUUCUUUAACU	400
AD-193783	A-383179	asasgcguGfaGfCfUfuuaaaauacaaL96	213	A-383180	usUfsguaUfuUfUfaagcUfcAfcgcuususu	307	AAAAGCGUGAGCUUAAAAUACAA	401
AD-194087	A-383787	gsgsuuuuCfgAfGfAfuuaucguuuuL96	214	A-383788	asAfsaacGfaUfAfaucCfgAfaaacscasc	308	GUGGUUUUCGAGAUUAUCGUUUU	402
AD-194120	A-383853	gsusauuuUfaAfAfAfuagcguucuuL96	215	A-383854	asAfsгааCfgCfUfauuuUfaAfaauacsusg	309	CAGUAAUUUAAAAUAGCGUUCUU	403
AD-193400	A-382413	ususguugUfcCfUfUfuucuaagguaL96	216	A-382414	usAfsccuAfuGfAfaagGfaCfaacaasusa	310	UAUUGUUGUCCUUUUAUAGGUC	404
AD-193887	A-383387	gsgsaaacGfaGfAfCfuuucauuuaL96	217	A-383388	usUfsaauGfgAfAfagucUfcGfuuuccsusg	311	CAGGAAACGAGACUUAUCCAUUAC	405
AD-194088	A-383789	gsusuuucGfaGfAfUfaucguuuuaL96	218	A-383790	usAfsaaaCfgAfUfaaucUfcGfaaaacscsa	312	UGGUUUUCGAGAUUAUCGUUUUC	406
AD-194163	A-383939	usgsgaguGfcUfGfUfuuuuguuaauL96	219	A-383940	asUfsauaAfcAfAfaacaGfcAfcuccasusc	313	GAUGGAGUGCUGUUUUGUUAUUAU	407
AD-193313	A-382240	uscsugauGfcAfGfCfuuaucgaaalL96	220	A-382241	usUfsucgUfaUfAfaagcGfcAfucagagsa	314	UCUCUGAUGCAGCUUAUACGAAA	408
AD-193314	A-382242	csusgaugCfaGfCfUfuuaucgaaauL96	221	A-382243	asUfsuucGfuAfUfaagcUfgCfaucagsasg	315	CUCUGAUGCAGCUUAUACGAAAU	409
AD-193534	A-382681	gsasuaguUfuUfCfAfuccauaacuaL96	222	A-382682	usAfsguuAfuGfGfauaAfaAfcuaucsusc	316	GAGAUAGUUUUAUCCAUAACUG	410
AD-193586	A-382785	uscsacauAfgCfCfAfcuuaauuuL96	223	A-382786	asAfsaugUfaAfGfuggGfcUfugugasasa	317	UUUCACAUAGCCCACUUAUUAU	411

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК в NM_002128.5	SEQ ID NO
AD-193706	A-383025	ususacauGfaGfGfAfcucuaucuuL96	224	A-383026	asAfsгааUfaGfAfguccUfcAfuguaasasg	318	CUUUACAUGAGGACUCUAUUCUU	412
AD-193841	A-383295	csusggcuAfuAfGfAfgucuuuucal96	225	A-383296	usGfsaaaAfgAfCfaucuAfuAfgccagscsa	319	UGCUGGCUAUAGAUUCUUUUCC	413
AD-194090	A-383793	ususcgaGfaUfUfAfcgucuuuucuuL96	226	A-383794	asAfsгааAfaCfGfaaaaUfcUfcgaaasasc	320	GUUUUCGAGAUUAUCGUUUUCUU	414
AD-194136	A-383885	ususcugUfaAfUfUfuuacacgcuuL96	227	A-383886	asAfsгсgUfgUfAfaaaUfaCfaagaascsg	321	CGUUCUUGUAAUUUACACGCUU	415
AD-193180	A-381975	asgsuuaaCfaCfAfcUaccgaauL96	228	A-381976	asCfsauuCfGfUfagugUfgUfuaacusasu	322	AUAGUUAACACACUACCGAAUGU	416
AD-193522	A-382657	asasguuaAfgUfUfGfagauuuuuL96	229	A-382658	asAfsaacUfaUfCfucaaCfuUfaacuususa	323	UAAAGUUAAGUUGAGAUAGUUUU	417
AD-193635	A-382883	asasgcaUGfgGfAfUfuaauagaauaL96	230	A-382884	usAfsuucUfaUfUfaaucCfcAfugcuusug	324	CAAAGCAUGGGAUUAUAGAAUC	418
AD-193717	A-383047	csuscuaUfcUfUfUfaacucccauuL96	231	A-383048	asAfsuggGfaGfUfuaaaGfaAfuagagsusc	325	GACUCUAUUCUUUAACUCCCAUU	419
AD-194137	A-383887	uscsuuguAfaUfUfUfuacacgcuuL96	232	A-383888	asAfsagcGfuGfUfaaaaUfuAfaagasasc	326	GUUCUUGUAAUUUACACGCUUU	420
AD-193179	A-381973	usasguuaAfcAfCfAfcuaccgaauaL96	233	A-381974	usAfsuucGfgUfAfguguGfuUfaacuasusa	327	UAUAGUUAACACACUACCGAAUG	421
AD-193181	A-381977	gsusuaacAfcAfCfUfaccgaauL96	234	A-381978	usAfscaUfcGfGfaguGfuGfuuaacsusa	328	UAGUUAACACACUACCGAAUGUG	422
AD-193312	A-382238	csuscugaUfgCfAfGfcuuuacgaaL96	235	A-382239	usUfscguAfuAfAfgcugCfaUfcagagsasc	329	GUCUCUGAUGCAGCUUAUACGAA	423
AD-193506	A-382625	ususugucUfaCfAfCfaccugcauaL96	236	A-382626	usAfsugcAfgGfGfugugUfaGfacaasasg	330	CUUUUGUCUACACCCUGCAUA	424
AD-193533	A-382679	asgsauagUfuUfUfCfauccauaacuL96	237	A-382680	asGfsuuaUfgGfAfugaaAfaCfuauuscscsa	331	UGAGAUAGUUUUAUCCAUAACU	425
AD-193629	A-382871	usascucaAfaGfCfAfugggauuuuL96	238	A-382872	asAfsuaaUfcCfCfaugcUfuUfgaguasgsa	332	UCUACUCAAGCAUGGGAUUAUU	426
AD-193726	A-383065	ususaacuCfcCfAfUfaccauguaaL96	239	A-383066	usUfsacaUfgGfUfaaUGfgAfguuasasg	333	CUUUAAUCCCAUUAACCAUGUAA	427
AD-193727	A-383067	usasacucCfcAfUfUfaccauguaaL96	240	A-383068	asUfsuacAfuGfGfuaauGfgGfaguuaasasa	334	UUUAAUCCCAUUAACCAUGUAAU	428
AD-193782	A-383177	asasagcgUfgAfGfCfuuaaaauacaL96	241	A-383178	usGfsuauUfuUfAfgcuCfaCfGcuuusug	335	CAAAGCGUGAGCUUAAAAUACA	429
AD-193805	A-383223	ususguugAfcAfUfUfagucucaguaL96	242	A-383224	usAfsugAfgAfCfuauuGfuCfaacaasasa	336	UUUUGUUGACAUUAGUCUCAGUG	430
AD-193507	A-382627	ususgucuAfcAfCfAfcuugcauuL96	243	A-382628	asUfsaugCfaGfGfguguGfuAfgacaasasa	337	UUUUGUCUACACCCUGCAUAU	431
AD-193592	A-382797	asgscccaCfuUfAfCfauuuacaaacL96	244	A-382798	gsUfsuugUfaAfAfuguaAfgUfgggcusasu	338	AUAGCCCACUUAUUAUACAAAC	432

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК в NM_002128.5	SEQ ID NO
AD-193697	A-383007	ususcuaaCfcUfUfUfacaugaggaaL96	245	A-383008	usUfscuUcfaUfGfuaaaGfgUfuagaascsa	339	UGUUCUAACCUUUACAUGAGGAC	433
AD-193702	A-383017	ascscuuuAfcAfUfGfaggacucuauL96	246	A-383018	asUfsagaGfuCfCfucauGfuAfaaggususa	340	UAACCUUUACAUGAGGACUCUAU	434
AD-193725	A-383063	ususuaacUfcCfCfAfuaaccauguaL96	247	A-383064	usAfscauGfgUfAfauggGfaGfuuaaasgsa	341	UCUUUAACUCCAUUACCAUGUA	435
AD-193881	A-383375	usgscucaGfgAfAfAfcgagacuuuaL96	248	A-383376	usAfsaagUfcUfCfguuuCfcUfgagcasgsu	342	ACUGCUCAGGAAACGAGACUUUC	436
AD-193178	A-381971	asusaguuAfaCfAfCfacuaccgaauL96	249	A-381972	asUfsucgGfuAfGfugugUfuAfacuausasc	343	GUUAAGUUAACACACUACCGAAU	437
AD-193315	A-382244	usgsaugcAfgCfUfUfauacgaaauaL96	250	A-382245	usAfsuuuCfgUfAfuagCfuGfcaucasgsa	344	UCUGAUGCAGCUUAUJACGAAUA	438
AD-193666	A-382945	uscsugucCfuUfGfAfaggacuaauaL96	251	A-382946	usAfsuuuGfuCfCfuucaAfgGfacagascsu	345	AGUCUGUCCUUGAAGGACUAAUA	439
AD-193888	A-383389	gsasaacgAfgAfCfUfuuccauuacaL96	252	A-383390	usGfsuaaUfgGfAfaaguCfuCfguuuucscsu	346	AGGAAACGAGACUUAUCCAUAUA	440
AD-194135	A-383883	gsusucuuGfuAfAfUfuuuuacacgcL96	253	A-383884	asGfscguGfuAfAfaauuAfcAfaagacsgsc	347	GCGUUCUUGUAAUUUACACGCU	441
AD-193479	A-382571	uscscuuuCfaUfAfUfaguuagcuuaL96	254	A-382572	usUfsagcUfaAfCfuuaUfGfAfaaggasusa	348	UAUCCUUUCAUAUAGUUAGCUAA	442
AD-193662	A-382937	asasagucUfgUfCfCfuugaaggacuL96	255	A-382938	asGfsuccUfuCfAfaaggaCfaGfacuuuscscsa	349	UGAAAGUCUGUCCUUGAAGGACU	443
AD-193669	A-382951	gsusccuuGfaAfGfGfacuaauagaalL96	256	A-382952	usUfscuaUfuAfGfuccuUfcAfaggacsasg	350	CUGUCCUUGAAGGACUAAUAGAA	444
AD-194134	A-383881	csgsuucuUfgUfAfAfuuuuacacgaL96	257	A-383882	usCfsgugUfaAfAfaauaCfaAfgaacgscsu	351	AGCGUUCUUGUAAUUUACACGC	445
AD-193175	A-381965	usgsuaaGfuUfAfAfcacacuaccaL96	258	A-381966	usGfsguaGfuGfUfguuAfcUfauacasasa	352	UUUGUAUAGUUAACACACUACCG	446
AD-193713	A-383039	asgsgacuCfuAfUfUfuuuuacucalL96	259	A-383040	usGfsaguUfaAfAfgaauAfgAfguccuscsa	353	UGAGGACUCUAUUCUUUAACUCC	447
AD-194140	A-383893	usgsuaauUfuUfAfCfacgcuuuuguL96	260	A-383894	asCfsaaaAfgCfGfuguaAfaAfuacacasg	354	CUUGUAAUUUACACGCUUUUGU	448
AD-194239	A-384091	asgsuccuGfgAfUfGfaucuaauaL96	261	A-384092	usUfsauuAfgUfAfucauCfcAfggacuscsa	355	UGAGUCCUGGAUGAUACUAAUAA	449
AD-193177	A-381969	usasuguUfaAfCfAfcacuaccgaalL96	262	A-381970	usUfscggUfaGfUfguguUfaAfcuaascsa	356	UGUAUAGUUAACACACUACCGAA	450
AD-193562	A-382737	asasaucUfuGfAfUfcaguuaagaaL96	263	A-382738	usUfscuuAfaCfUfgaucAfaGfauuuusgsg	357	CCAAAUCUUGAUCAGUUAAGAA	451
AD-193630	A-382873	ascsucaaAfgCfAfUfgggauuauuaL96	264	A-382874	usAfsauaAfuCfCfcaugCfuUfugagusasg	358	CUACUCAAGCAUGGGAUUAUUA	452
AD-193731	A-383075	uscsccauUfaCfCfAfuguaauggcaL96	265	A-383076	usGfsccaUfuAfCfauggUfaAfugggagsgsu	359	ACUCCCAUUACCAUGUAAUGGCA	453

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мПНК в NM_002128.5	SEQ ID NO
AD-193804	A-383221	ususuguuGfaCfAfUfuagucucaguL96	266	A-383222	asCfsugaGfaCfUfaaugUfcAfacaasasa	360	UUUUUGUUGACAUUAGUCUCAGU	454
AD-194238	A-384089	gsasguccUfgGfAfUfgauacuaaL96	267	A-384090	usAfsuuaGfuAfUfcaucCfaGfgacucsasg	361	CUGAGUCCUGGAUGAUACUAAUA	455
AD-193168	A-381951	ususuuuaAfaCfUfGfuacagugucuL96	268	A-381952	asGfsacaCfuGfUfacagUfuUfaaaascsa	362	UGUUUUUAAACUGUACAGUGUCU	456
AD-193174	A-381963	usugsuauAfgUfUfAfacacacuacL96	269	A-381964	usGfsuagUfgUfGfuuaaCfuAfuacaasasa	363	UUUUGUAUAGUUAACACACUACC	457
AD-193182	A-381979	ususaacaCfaCfUfAfccgaugugul96	270	A-381980	asCfsacaUfuCfGfguagUfgUfguuascsu	364	AGUUAACACACUACCGAAUGUGU	458
AD-193524	A-382661	gsusuaagUfuGfAfGfauaguuuL96	271	A-382662	usGfsaaaAfcUfAfucucAfaCfuuaacsusu	365	AAGUUAAGUUGAGAUAGUUUUCA	459
AD-193833	A-383279	usgsaaaaUfgCfUfGfgcuauagauL96	272	A-383280	usAfsucuAfuAfGfccagCfaUfuucasusa	366	UAUGAAAAUGCUGGCUAUAGAUG	460
AD-194218	A-384049	asgsgaggAfaUfAfCfugaacuaL96	273	A-384050	usAfsgauGfuUfCfaguaUfuCfuccusgsa	367	UCAGGAGGAUACUGAACAUUCUG	461
AD-193173	A-381961	ususuguaUfaGfUfUfaacacacuaL96	274	A-381962	usUfsaguGfuGfUfuaacUfaUfacaasasa	368	UUUUUGUAUAGUUAACACACUAC	462
AD-193690	A-382993	asasguauGfuUfCfUfaacuuuacL96	275	A-382994	usGfsuaaAfgGfUfuaaAfcAfuacuususu	369	AAAAGUAUGUUCUAAACCUUUACA	463
AD-193907	A-383427	usasaauaAfuUfGfGfgccagcuuuL96	276	A-383428	asAfsaagCfuGfGfcccaAfuUfaauuasasa	370	UUUAAUUAUUGGGCCAGCUUUU	464
AD-193633	A-382879	csasaagcAfuGfGfGfauuuuagaaL96	277	A-382880	usUfscuaAfuAfAfucccAfuGfcuuugsasg	371	CUCAAAGCAUGGGAUUAUUAGAA	465
AD-193667	A-382947	csusguccUfuGfAfAfggacuaaL96	278	A-382948	usUfsauuAfgUfCfcuucAfaGfgacagsasc	372	GUCUGUCCUUGAAGGACUAAUAG	466
AD-193737	A-383087	usasccauGfuAfAfUfggaguuuaL96	279	A-383088	usAfsuaaCfuGfCfcauuAfcAfugguasasu	373	AUUACCAUGUAAUGGCAGUUAUA	467
AD-193870	A-383353	usasaauaUfgGfAfCfugcucaggaaL96	280	A-383354	usUfscuGfaGfCfagucCfaUfauuasgsa	374	UCUAAAUUGGACUGCUCAGGAA	468
AD-193176	A-381967	gsusauagUfuAfAfCfacacuaccgaL96	281	A-381968	usCfsgguAfgUfGfuguuAfaCfuauacsasa	375	UUGUAUAGUUAACACACUACCGA	469
AD-193705	A-383023	ususuaaUfgAfGfGfacucuaauL96	282	A-383024	asGfsaaaAfgAfGfucccCfaUfguaasgsg	376	CCUUUACAUGAGGACUCUAAUUCU	470
AD-193729	A-383071	ascsucccAfuUfAfCfcauguaaL96	283	A-383072	usCfsauuAfcAfUfgguaAfuGfggagususa	377	UAAUCUCCAUUACCAUGUAAUGG	471
AD-193498	A-382609	asasaaagCfuUfUfUfgucuaacaaL96	284	A-382610	usUfsgugUfaGfAfcaaaAfgCfuuuuasasu	378	AUAAAAAGCUUUUGUCUACACAC	472
AD-193535	A-382683	asusaguuUfuCfAfUfccuaacugaL96	285	A-382684	usCfsaguUfaUfGfgaugAfaAfacuauscsu	379	AGAUAGUUUUAUCCAUAACUGA	473
AD-193640	A-382893	usgsggauUfaUfUfAfgaaucacaaL96	286	A-382894	usGfsuuuGfaUfUfcuaaUfaAfucccasusg	380	CAUGGGAUUAUAGAAUCAAAACA	474

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Последовательность смысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Название антисмыслового олигонуклеотида	Последовательность антисмысловой нити в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевая последовательность мПНК в NM_002128.5	SEQ ID NO
AD-193422	A-382457	gsgsgaagCfuAfGfUfcuuuugcuuuL96	287	A-382458	asAfsagcAfaAfAfgacuAfgCfuuccscsu	381	AGGGGAAGCUAGUCUUUUGCUUU	475
AD-193527	A-382667	asasguugAfgAfUfAfguuuucaucaL96	288	A-382668	usGfsaugAfaAfAfcuauCfuCfaacuusasa	382	UUAAGUUGAGAUAGUUUUAUCC	476
AD-193577	A-382767	usasagaaAfuUfUfCfacauagcccaL96	289	A-382768	usGfsggcUfaUfGfugaaAfuUfucuasasc	383	GUUAAGAAUUUACAUAGCCCA	477
AD-193905	A-383423	ususuaauUfaAfUfUfgggccagcuuL96	290	A-383424	asAfsghcuGfgCfCfaauUfaAfuuaasasa	384	UUUUUAAUUAAUUGGGCCAGCUU	478
AD-194089	A-383791	usuuuugAfgAfUfUfaucguuuuL96	291	A-383792	asGfsaaaAfcGfAfuauCfuCfuaaascsc	385	GGUUUUCGAGAUUAUCGUUUUCU	479
AD-193625	A-382863	asasucuaCfuCfAfAfgcaugggaul96	292	A-382864	asUfscuuAfuGfCfuugAfgUfagauusgsa	386	UCAUCUACUCAAGCAUGGGAU	480
AD-193875	A-383363	asusggacUfgCfUfCfaggaaacgaaL96	293	A-383364	usUfscguUfuCfCfugagCfaGfuccuasasu	387	AUAUGGACUGCUCAGGAAACGAG	481
AD-194234	A-384081	asuscugaGfuCfCfUfggaugauacuL96	294	A-384082	asGfsuauCfaUfCfcaggAfcUfcagausgsu	388	ACAUCUGAGUCCUGGAUGAUACU	482
AD-193311	A-382236	uscsucugAfuGfCfAfgcuuauacgaL96	295	A-382237	usCfsguaUfaAfGfcugcAfuCfagagascsa	389	UGUCUCUGAUGCAGCUUAUACGA	483
AD-193744	A-383101	usasauggCfaGfUfUfauuuuugcaL96	296	A-383102	usGfscaaAfaUfAfuacUfgCfauuascsa	390	UGUAAUGGCAGUUUAUUUUUGCA	484
AD-193877	A-383367	gsgsacugCfuCfAfGfgaaacgagaaL96	297	A-383368	usUfscucGfuUfUfccugAfgCfaguccsas	391	AUGGACUGCUCAGGAAACGAGAC	485
AD-192647	A-380909	gsusgcaaAfcUfUfGfucgggaggaaL96	298	A-380910	usUfscuuCfcCfGfacaGfuUfugacacsasa	392	UUGUGCAAACUUGUCGGGAGGAG	486

Пример 3 - нокдаун экспрессии HMGB1 с помощью однократной дозы siRNA HMGB1

Ряд средств на основе dsRNA, целенаправленно воздействующих на HMGB1 мыши, сконструировали и протестировали в отношении способности к нокдауну экспрессии mRNA HMGB1 у самок мышей C57Bl/6 в возрасте 6-8 недель. Перечень дуплексов приведен в таблице 6.

Дуплекс AD-80644 включает одно ошибочное спаривание пары оснований в положении 1 антисмысловой нити по сравнению с последовательностью mRNA человека. Дуплексы AD-80652 и AD-80653 идеально совпадают с антисмысловой нитью по сравнению с последовательностью mRNA человека. Дуплексы AD-80646, AD-80651 и AD80652 включают несколько несовпадений между последовательностями мыши и человека.

Однократную дозу шести выбранных средств на основе dsRNA или контроля PBS вводили подкожно в день 1 в дозе, составляющей 3 мг/кг (n=3 на группу). В дни 7 и 21 после введения дозы мышей подвергали голоданию в течение 5 часов до умерщвления для удаления гликогена из печени с целью облегчения визуализации печени, печень отбирали и анализировали экспрессию HMGB1.

РНК выделяли с использованием набора RNeasy plus (Qiagen, № кат. 74136). 1 мкг общей РНК транскрибировали в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции "ABI® High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, № кат. 4368813), в каждом случае в соответствии с протоколом производителя.

Один мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (4352339E), 0,5 мкл зонда с HMGB1 для мыши (Mm00849805_gH), 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № кат. 04887301001) и 3 мкл воды, очищенной от нуклеаз, на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № кат. 04887301001). Реакции осуществляли в трех параллелях. ПЦР в режиме реального времени осуществляли в системе LightCycler480 Real Time PCR (Roche). Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta Ct$ и нормализовали относительно животных, обработанных PBS. Результаты показаны в таблице ниже.

	День 7	станд. отклон.	День 21	станд. отклон.
PBS	101,6365	21,35079	100,0892	5,139943
AD-80644	17,72006	0,911535	21,8557	4,188224
AD-80646	16,06716	3,34729	19,21384	3,47529
AD-80648	67,76202	7,184302	103,9695	16,18052
AD-80651	18,60321	0,45585	30,74869	8,934711
AD-80652	11,1124	1,73809	14,60145	1,346553
AD-80653	10,98006	1,528939	14,96498	3,3726

На основе этих данных дуплекс AD-80653 выбирали для дополнительных

Таблица 6. Модифицированные последовательности HMGB1

Название дуплекса	Нить (S = смысловая; AS = антисмысловая)	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида (модифицированная) в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность олигонуклеотида (немодифицированная) в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-80644	S	A-161392	gsusaagaUfuUfGfUfuuuuaaacuL96	487	GUAAAGAUUUGUUUUUAAACUA	499
	AS	A-161393	VPusAfsgruuUfaAfAfaacaAfaUfcuuacsasc	488	UAGUUUAAAAACAACAAUCUUAACAC	500
AD-80646	S	A-161396	ascsagaagAfuAfAfUfuguuuguuacuL96	489	ACGAAGAUAAUUGUUGUUCUA	501
	AS	A-161397	VPusAfsгааCfaAfCfaauuAfuCfuucgusasuu	490	UAGAACACAAAUUAUUCUUCGUUAU	502
AD-80648	S	A-161400	csasucccUfaAfUfCfuuaacaauuaL96	491	CAUCCCUAAUCUAUACAUAUA	503
	AS	A-161401	VPusAfsuauGfuAfUfagauUfaGfggauagscsuu	492	UAUAUGUAUAAGAUUAGGGGAUGCU	504
AD-80651	S	A-161406	usgsagauGfcUfGfUfuuaauaauuaL96	493	UGGAGUGGCUUUAUAUAUAUA	505
	AS	A-161407	VPusAfsauuAfuAfUfacaGfcAfcuaccasusc	494	UAAUUAUAUAACAGCACUCCAUUC	506
AD-80652	S	A-161408	gscsacagCfaCfAfAfauuaguuaual96	495	GCACAGCACAAAAUAGUUUAUA	507
	AS	A-161409	VPusAfsuuaCfuAfAfuuuugUfgCfugugcsasc	496	UAUAACUAAUUUGUGUGUGGCAC	508
AD-80653	S	A-161410	csusgaauGfcUfUfCfuuaaguuaauuaL96	497	CUGAAUGCUUCUUAAGUAAAUA	509
	AS	A-161411	VPusAfsuuuAfcUfUfagaaGfcAfuucagsasa	498	UAUUUACUUAGAAGCAUUCAGAA	510

Пример 4 - лечение нарушений, ассоциированных с HMGB1, с помощью iRNA HMGB1

Мышиную модель NASH, которой скормливали рацион с высоким содержанием

жира и фруктозы (HF HFr) (Softic et al. J Clin Invest 127 (11): 4059-4074, 2017, включенная в данный документ посредством ссылки), использовали для демонстрации эффективности siRNA HMGB1 в лечении NASH и симптомов метаболического нарушения.

Самцам мышей C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель, полученных от Jackson Laboratories, скормливали рацион с высоким содержанием жира, содержащий 60% калорий, приходящихся на жиры, и 30% фруктозы в воде (рацион Hf Hfr) в течение 12 недель до обработки средством на основе dsRNA с целью индуцирования NASH или скормливали стандартный корм и воду. Еду и воду предоставляли *ad libitum*. Как и ожидалось, вес тела и вес печени был значительно выше у мышей, получавших HF HFr. На повреждение печени указывало значительное повышение уровней глутаматдегидрогеназы (GLDH), аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) в сыворотке крови у мышей на Hf Hfr. Для подтверждения развития NASH проводили гистологический анализ печени. Вакуолизацию, воспаление, баллонную дистрофию и фиброз наблюдали у мышей, получавших рацион Hf Hfr, но ни у одной из мышей, получавших стандартный корм. Эти данные демонстрируют, что рацион Hf Hfr являлся эффективным для создания фенотипа NASH. В результате скормливания рациона Hf Hfr также наблюдали ряд признаков, связанных с метаболическим синдромом, включая повышение уровня инсулина и глюкозы в сыворотке крови и повышение уровня холестерина в сыворотке крови.

Начиная с недели 12, мышам, получавшим HF HFr, подкожно вводили siRNA в дозе 10 мг/кг, целенаправленно воздействующую на HMGB1 (AD-80653), один раз в две недели в общей сложности четыре дозы. Через две недели после последней дозы (на 20 неделе) отбирали печень, выделяли РНК и определяли нокдаун HMGB1 с помощью rtPCR с использованием способа, описанного выше. У мышей, которым скормливали HF HFr, обработанных siRNA HMGB1, наблюдали снижение mRNA HMGB1 в печени на 94% по сравнению с мышами, получавшими HF HFr, обработанными PBS.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 ослабила некоторые побочные эффекты, обусловленные рационом Hf Hfr, за счет снижения веса печени, выраженного в виде процента от веса тела, и снижения уровней триглицеридов в печени. Результаты показаны в таблице ниже.

Параметры на 20 неделе	LFD+PBS (N=5)	HF HFr+PBS (N=9)	HF HFr+HMGB1 (N=9)	р-значения	% снижения при HF HFr+HMGB1 по сравнению с HF HFr+PBS
Вес печени (% BW)	4,16 +/- 0,19	6,35 +/- 0,46	5,10 +/- 0,24	0,08	20
Триглицериды в печени (мг/г печени)	21,96 +/- 3,02	77,21 +/- 5,41	36,39 +/- 3,84	0,001	53

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. р-значения

получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и представляют сравнение между HF HF_r+PBS и HF HF_r+HMGB1.

Уровень холестерина в сыворотке крови также значительно снижался (56%, $p=0,0001$) у мышей, получавших HF HF_r, обработанных siRNA HMGB1, по сравнению с мышами, получавшими HF HF_r, обработанными PBS.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 также нормализовала экспрессию генов, связанных с метаболизмом липидов, что показано в таблице ниже. Значения выражены в виде относительного кратного изменения от HF HF_r+PBS.

Гены	LFD+PBS (N=5)	HF HF _r +PBS (N=9)	HF HF _r +HMGB1 (N=9)	p- значени я
SREBP2	1,3 +/- 0,08	1,03 +/- 0,08	0,76 +/- 0,05	0,01
ACC2	1,06 +/- 0,08	1,02 +/- 0,07	0,46 +/- 0,02	0,0001
SCD1	0,72 +/- 0,13	1,03 +/- 0,09	0,73 +/- 0,06	0,03
HMG Co-A-редуктаза	0,63 +/- 0,1	1,04 +/- 0,1	0,58 +/- 0,02	0,0005
PCSK9	0,96 +/- 0,2	1,09 +/- 0,17	0,42 +/- 0,04	0,0026

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. p-значения получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и представляют сравнение между HF HF_r+PBS и HF HF_r+HMGB1.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 также улучшила некоторые средние значения NAS и оценки в баллах фиброза на основе гистопатологических данных, что показано ниже.

Оценка в баллах при гистопатологическом исследовании и NAS на 20 неделе	LFD+PBS (N=5)	HF HF _r +PBS (N=9)	HF HF _r +HMGB1 (N=9)	p- значени я
Балл стеатоза	0	2,88 +/- 0,1	2,44 +/- 0,2	0,03
Лобулярное воспаление	0	1,7 +/- 0,2	1,0 +/- 0	0,0001
Баллонная дистрофия	0	1,0 +/- 0	1,0 +/- 0	1
Средний балл NAS	0	5,6 +/- 0,2	4,4 +/- 0,2	0,003
Балл фиброза	0	1 +/- 0,2	0,56 +/- 0,2	0,3

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. p-значения получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и представляют сравнение HF HF_r+PBS и HF HF_r+HMGB1.

Каких-либо существенных изменений в экспрессии генов воспаления или фиброза, сывороточных биомаркеров повреждения печени, инсулина или глюкозы в сыворотке крови не наблюдали.

Второй эксперимент проводили с использованием тех же мышинной модели и схемы введения доз, которые описаны выше. Некоторые из проанализированных конечных точек отличались во втором исследовании. Результаты данного исследования представлены ниже.

Вкратце, как описано выше, для индуцирования NASH самцам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель, полученных от Jackson Laboratories, скормливали рацион с высоким содержанием жира, содержащим 60% калорий, приходящихся на жиры, и 30% фруктозы в воде (рацион Hf Hfr) в течение 12 недель до обработки или скормливали стандартный корм и воду.

Начиная с недели 12, мышам, получавшим HF HFr, подкожно вводили siRNA в дозе 10 мг/кг, целенаправленно воздействующую на HMGB1 (AD-80653), один раз в две недели в общей сложности четыре дозы. Через две недели после последней дозы (на 20 неделе) отбирали печень, выделяли РНК и определяли нокдаун HMGB1 с помощью rtPCR с использованием способа, описанного выше. У мышей, которым скормливали HF HFr, обработанных siRNA HMGB1, наблюдали снижение mRNA HMGB1 в печени на 90% по сравнению с мышами, получавшими HF HFr, обработанными PBS.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 ослабила некоторые побочные эффекты, обусловленные рационом Hf Hfr, за счет снижения веса печени, выраженного в виде процента от веса тела, уровней триглицеридов в печени, незатерифицированного холестерина в печени и свободных жирных кислот в печени. Результаты показаны в таблице ниже.

Параметры на 20 неделе	LFD+PBS (N=5)	HF HFr+PBS (N=9)	HF HFr+HMGB1 (N=9)	р-значения	% снижения при HF HFr+HMGB1 по сравнению с HF HFr+PBS
Вес печени (% BW)	4,17 +/- 0,21	6,37 +/- 0,23	5,07 +/- 0,19	0,01	20,5
Триглицериды в печени (мг/г печени)	22,25 +/- 1,74	110,95 +/- 3,27	50,78 +/- 5,28	0,0001	54,2
Незатерифицированный холестерин печени (мг/г печени)	2,30 +/- 0,03	3,10 +/- 0,08	2,50 +/- 0,1	0,0006	19,4
Свободные жирные кислоты печени	1,86 +/- 0,06	2,55 +/- 0,09	1,98 +/- 0,09	0,0002	22,3

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. р-значения получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и представляют сравнение между HF HFr+PBS и HF HFr+HMGB1.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 также приводила к снижению уровня холестерина в сыворотке крови, холестерина LDL и незатерифицированной жирной кислоты (NEFA) в сыворотке крови. Было отмечено повышение уровней триглицеридов в сыворотке крови, связанное с обработкой siRNA HMGB1. Результаты показаны в таблице ниже.

Параметры на 20 неделе	LFD+PBS (N=5)	HF HFr+PBS (N=9)	HF HFr+HMGB1 (N=9)	р-значения	% снижения при HF HFr+HMGB1 по сравнению с HF
------------------------	---------------	------------------	--------------------	------------	---

					HFr+PBS
Холестерин в сыворотке крови (мг/дл)	80,36 +/- 1,75	229,1 +/- 17,65	102,6 +/- 6,72	0,0001	55,2
Триглицериды в сыворотке крови (мг/дл)	73,68 +/- 4,73	71,79 +/- 5,8	94,44 +/- 5,35	0,008	-31,9
NEFA в сыворотке крови (мМ)	0,88 +/- 0,06	0,92 +/- 0,06	0,74 +/- 0,04	0,04	19
Холестерин LDL в сыворотке крови (мг/дл)	7 +/- 0	12,62 +/- 1,57	7,71 +/- 0,32	0,0001	20,4

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. р-значения получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и изображают представление сравнение HF HFr+PBS и HF HFr+HMGB1.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 также улучшила среднее значение NAS и оценки в баллах фиброза на основе гистопатологических данных, что показано в таблице ниже.

Оценка в баллах при гистопатологическом исследовании и NAS на 20 неделе	LFD+PBS (N=5)	HF HFr+PBS (N=9)	HF HFr+HMGB1 (N=9)	р-значение
Балл стеатоза	0	2,9 +/- 0,1	1,5 +/- 0,24	<0,0001
Лобулярное воспаление	0	1,0 +/- 0	0,4 +/- 0,18	0,02
Баллонная дистрофия	0	0,3 +/- 0,17	0 +/- 0	0,16
Средний балл NAS	0	4,2 +/- 0,22	2 +/- 0,37	0,0001

Каждое значение представляет собой среднее значение +/- SEM. р-значения получены из статистического анализа с использованием однофакторного ANOVA и представляют сравнение HF HFr+PBS и HF HFr+HMGB1.

Обработка с помощью siRNA HMGB1 также умеренно снижала уровни ALT и AST и глутаматдегидрогеназы (GLDH) в сыворотке крови.

Эти данные демонстрируют, что siRNA HMGB1 является эффективным в лечении нарушений, ассоциированных с HMGB1, например, метаболического нарушения и NAFLD, например, NASH.

Пример 5 - нокдаун экспрессии HMGB1 с помощью однократной дозы siRNA

HMGB1

Ряд средств на основе dsRNA, целенаправленно воздействующих на HMGB1 мыши, сконструировали и протестировали в отношении способности к нокдауну экспрессии mRNA HMGB1 у самок мышей C57Bl/6 в возрасте 6-8 недель. Дуплексы, которые оценивали, перечислены в таблице 7 ниже.

Таблица 7. Модифицированные и немодифицированные последовательности HMGB1

Название дуплекса	Нить	Немодифицированная последовательность HMGB1 в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Модифицированная последовательность в направлении от 5' к 3'	SEQ ID NO	Целевой сайт под NM_002128.5
AD-245281	смысловая	UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU	511	usasaguUGfgUfUfCfuagcgaguuL96	525	830-850
	антисмысловая	AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU	512	asAfsucgc(Ggn)cuagaaCfcAfacuuasusu	526	828-850
AD-245282	смысловая	AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU	513	asasguugGfuUfCfUfagcgaguuuL96	527	831-851
	антисмысловая	AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU	514	asAfsacug(Cgn)gcuagaAfcCfaacuusasusu	528	829-851
AD-245305	смысловая	UUGAAAUGUAAGGCUGUGUAA	515	usugaaaUfgUfAfAfggcuguguaaL96	529	917-937
	антисмысловая	UUACACAGCCUUACAUUUCAAUU	516	usUfsacac(Agn)gccuuuCfaUfuucaasusu	530	915-937
AD-245336	смысловая	UAUAGUUAACACACUACCGAA	517	usasuaguUfaAfcCfAfcacuaccgaaL96	531	972-992
	антисмысловая	UUCGGUAGUGUGUUAACUUAACA	518	usUfscggg(Agn)guguguUfaAfcuauascsa	532	970-992
AD-245339	смысловая	AGUUAACACACUACCGAAUGU	519	asgsuuaaCfaCfAfCfuaccgaauguL96	533	975-995
	антисмысловая	ACAUUCGGUAGUGUGUUAACUUAU	520	asCfsauuc(Ggn)guagugUfgUfuaacusasu	534	973-995
AD-245383	смысловая	UGGUUUUUCAAUAGCCACUA	521	usgsuauUfuUfCfAfauagccacuaL96	535	1019-1039
	антисмысловая	UAGUGGCUAUUGAAAAUACCACC	522	usAfsuggg(Cgn)uauugaAfaAfuaccascsc	536	1017-1039
AD-245472	смысловая	UCUGAUGCAGCUUAUACGAAA	523	uscsugauGfcAfGfCfuuaacgaaaL96	537	1160-1180
	антисмысловая	UUUCGUUAUAGCUGCAUCAGAGA	524	usUfsucgu(Agn)uaagcuGfcAfucagasgsa	538	1158-1180

Однократную дозу одного из средств на основе dsRNA или контроля PBS вводили подкожно в день 1 в дозе, составляющей 10 мг/кг (n=3 на группу). В день 14 после введения дозы мышей умерщвляли, печень отбирали и анализировали экспрессию HMGB1.

РНК выделяли с использованием набора RNeasy plus (Qiagen, № кат. 74136). Один мкг общей РНК транскрибировали в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции "ABI® High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, № кат. 4368813), в каждом случае в соответствии с протоколом производителя.

Один мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (4352339E), 0,5 мкл зонда с HMGB1 для мыши (Mm00849805_gH), 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № кат. 04887301001) и 3 мкл воды, очищенной от нуклеаз, на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № кат. 04887301001). Реакции осуществляли в трех параллелях. ПЦР в режиме реального времени осуществляли в системе LightCycler480 Real Time PCR (Roche). Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно животных, обработанных PBS. Результаты показаны в таблице 8.

Таблица 8.

Название дуплекса	Среднее значение	SEM
PBS	1,00	0,06
AD-245281	0,15	0,02
AD-245282	0,13	0,02
AD-245305	0,26	0,02
AD-245336	0,23	0,01
AD-245339	0,19	0,03
AD-245383	0,28	0,02
AD-245472	0,20	0,02

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалисты в данной области техники распознают или будут способны определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии белка бокса-1 высокомолекулярной группы (HMGB1), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

2. Средство на основе dsRNA по п. 1, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1019-1039, 1158-1194, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182, или 1174-1194 SEQ ID NO:1.

3. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности с mRNA, кодирующей HMGB1, содержащий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, перечисленных в любой из таблицы 3, таблицы 5, таблицы 6 или таблицы 7.

4. Средство на основе dsRNA по п. 3, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-193181, AD-80651 и AD-80652.

5. Средство на основе dsRNA по п. 4, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности смысловой нити AD-245281 (5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3') (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности антисмысловой нити AD-245281 (5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3') (SEQ ID NO:512).

6. Средство на основе dsRNA по п. 5, где смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-

AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512).

7. Средство на основе dsRNA по п. 5, где нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512).

8. Средство на основе dsRNA по п. 5, где смысловая нить содержит 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-UAAGUUGGUUCUAGCGCAGUU-3' (SEQ ID NO:511), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AACUGCGCUAGAACCAACUUAUU-3' (SEQ ID NO:512).

9. Средство на основе dsRNA по п. 4, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности смысловой нити AD-245282 (5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3') (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности антисмысловой нити AD-245282 (5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3') (SEQ ID NO:514).

10. Средство на основе dsRNA по п. 9, где смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514).

11. Средство на основе dsRNA по п. 9, где смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514).

12. Средство на основе dsRNA по п. 9, где смысловая нить содержит 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AAGUUGGUUCUAGCGCAGUUU-3' (SEQ ID NO:513), и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности 5'-AAACUGCGCUAGAACCAACUUAU-3' (SEQ ID NO:514).

13. Средство на основе dsRNA по п. 3, где смысловая нить и антисмысловая нить содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей в любой из таблицы 3, таблицы 5, таблицы 6 или таблицы 7.

14. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-13, где средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

15. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-13, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат нуклеотидную

модификацию.

16. Средство на основе dsRNA по п. 15, где смысловая нить содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-usasaguuGfgUfUfCfuagcgcaguu-3' (SEQ ID NO:525), и антисмысловая нить содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-asAfscugc(Ggn)cuagaaCfcAfacuuasusu-3' (SEQ ID NO:526), где а представляет собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, с представляет собой 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, g представляет собой 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и представляет собой 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, Af представляет собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, Cf представляет собой 2'-фторцитидин-3'-фосфат, Gf представляет собой 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, Uf представляет собой 2'-фторуридин-3'-фосфат, (Ggn) представляет собой гуанозин-гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA), и s представляет собой фосфотиоатную связь.

17. Средство на основе dsRNA по п. 16, дополнительно содержащее N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол, ковалентно связанный с 3'-концом смысловой нити.

18. Средство на основе dsRNA по п. 15, где смысловая нить содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-asasguugGfuUfCfUfagcgcaguuu-3' (SEQ ID NO:527), и антисмысловая нить содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-asAfsacug(Cgn)gcuagaAfcCfaacuusasu-3' (SEQ ID NO:528), где а представляет собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, с представляет собой 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, g представляет собой 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат, и представляет собой 2'-О-метилуридин-3'-фосфат, Af представляет собой 2'-фтораденозин-3'-фосфат, Cf представляет собой 2'-фторцитидин-3'-фосфат, Gf представляет собой 2'-фторгуанозин-3'-фосфат, Uf представляет собой 2'-фторуридин-3'-фосфат, (Cgn) представляет собой цитидин-гликоль-нуклеиновую кислоту (GNA), и s представляет собой фосфотиоатную связь.

19. Средство на основе dsRNA по п. 18, дополнительно содержащее N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипролинол, ковалентно связанный с 3'-концом смысловой нити.

20. Средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе двухнитевой РНК содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2,

где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, и

где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

21. Средство на основе dsRNA по п. 20, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности из любого из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1019-1039, 1158-1194, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182 или 1174-1194 в SEQ ID NO:1.

22. Средство на основе dsRNA по п. 20 или п. 21, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат нуклеотидную модификацию.

23. Средство на основе dsRNA по п. 20 или п. 21, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

24. Средство на основе dsRNA по п. 23, где модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

25. Средство на основе dsRNA по п. 3, где длина участка комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов.

26. Средство на основе dsRNA по п. 3, где длина участка комплементарности составляет 19-21 нуклеотид.

27. Средство на основе dsRNA по п. 26, где длина участка комплементарности составляет 19 нуклеотидов.

28. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-27, где длина каждой нити независимо составляет не более чем 30 нуклеотидов.

29. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-27, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

30. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-27, где по меньшей мере одна

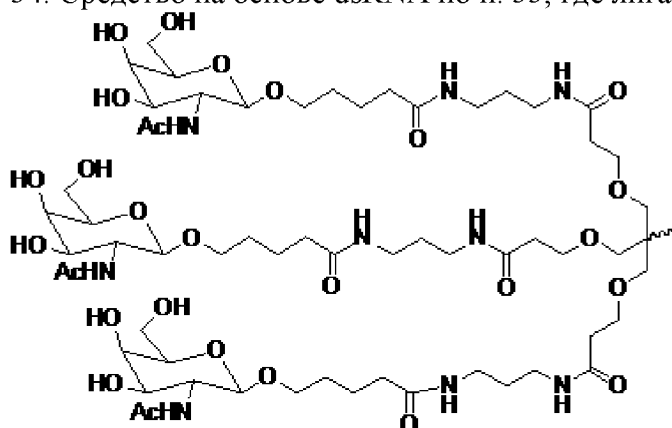
нить содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

31. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-16 и п. 18, дополнительно содержащее лиганд.

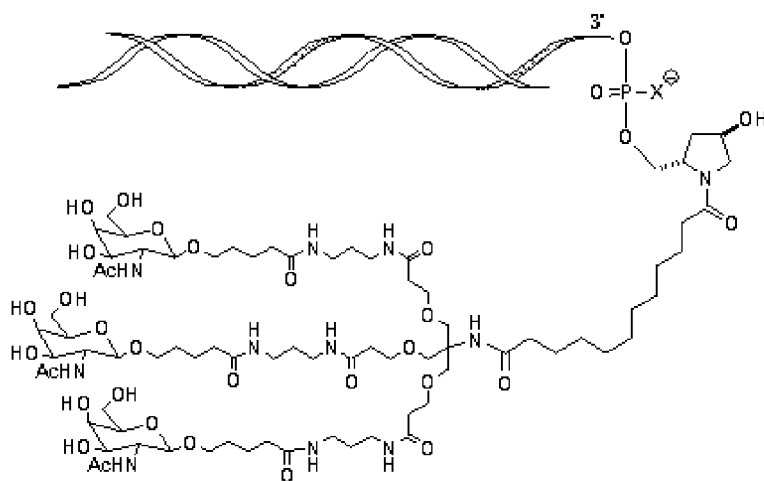
32. Средство на основе dsRNA по п. 31, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити средства на основе dsRNA.

33. Средство на основе dsRNA по п. 20 или п. 31, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

34. Средство на основе dsRNA по п. 33, где лиганд представляет собой



35. Средство на основе dsRNA по п. 34, где средство на основе dsRNA конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме,



и где X представляет собой O или S.

36. Средство на основе dsRNA по п. 35, где X представляет собой O.

37. Средство на основе dsRNA по п. 3 или п. 4, где участок комплементарности содержит любую из антисмысловых нуклеотидных последовательностей из любой из таблицы 3, таблицы 5, таблицы 6 или таблицы 7.

38. Средство на основе dsRNA по п. 3 или п. 4, где участок комплементарности состоит из любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей из любой из таблицы 3, таблицы 5, таблицы 6 или таблицы 7.

39. Средство на основе dsRNA по п. 37 или п. 38, где антисмысловая нуклеотидная последовательность представляет собой антисмысловую последовательность дуплекса,

выбранного из группы, состоящей из AD-245281, AD-245282, AD-245305, AD-245336, AD-245339, AD-245383, AD-245472, AD-193177, AD-193312, AD-193168, AD-193313, AD-193180, AD-193182, AD-193314, AD-193173, AD-193311, AD-193179, AD-193178, AD-193174, AD-193315, AD-193175, AD-193326, AD-193176, AD-193181, AD-80651 и AD-80652.

40. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-39, где длина двухнитевого участка составляет 15-30 пар нуклеотидов.

41. Средство на основе dsRNA по п. 40, где длина двухнитевого участка составляет 17-23 пары нуклеотидов.

42. Средство на основе dsRNA по п. 40, где длина двухнитевого участка составляет 17-25 пар нуклеотидов.

43. Средство на основе dsRNA по п. 40, где длина двухнитевого участка составляет 23-27 пар нуклеотидов.

44. Средство на основе dsRNA по п. 40, где длина двухнитевого участка составляет 19-21 пару нуклеотидов.

45. Средство на основе dsRNA по п. 20, где длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

46. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-45, где каждая нить независимо содержит 19-30 нуклеотидов.

47. Средство на основе dsRNA по п. 20, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила, GNA и их комбинаций.

48. Средство на основе dsRNA по п. 47, где модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

49. Средство на основе dsRNA по п. 20, где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

50. Средство на основе dsRNA по п. 20, где средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

51. Средство на основе dsRNA по п. 50, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити.

52. Средство на основе dsRNA по п. 51, где нить представляет собой антисмысловую нить.

53. Средство на основе dsRNA по п. 51, где нить представляет собой смысловую нить.

54. Средство на основе dsRNA по п. 50, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити.

55. Средство на основе dsRNA по п. 54, где нить представляет собой антисмысловую нить.

56. Средство на основе dsRNA по п. 54, где нить представляет собой смысловую

нить.

57. Средство на основе dsRNA по п. 50, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити.

58. Средство на основе dsRNA по п. 57, где нить представляет собой антисмысловую нить.

59. Средство на основе dsRNA по п. 20, где парой оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой нити двухнитевого участка является пара оснований AU.

60. Средство на основе dsRNA по п. 56, где смысловая нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

61. Средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA) для подавления экспрессии HMGB1, где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2,

где практически все нуклеотиды смысловой нити содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

где смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где практически все нуклеотиды антисмысловой нити содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

где антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и

где смысловая нить конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера на 3'-конце.

62. Средство на основе dsRNA по п. 61, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности из любого из нуклеотидов 830-851, 830-850, 831-851, 917-937, 944-997, 944-990, 944-964, 968-997, 968-990, 968-995, 968-988, 969-989, 970-990, 971-991, 972-992, 972-995, 973-993, 974-994, 975-995, 976-996, 977-997, 1019-1039, 1158-1194, 1158-1182, 1158-1178, 1159-1179, 1160-1180, 1161-1181, 1162-1182 или 1174-1194 в SEQ ID NO:1.

63. Средство на основе dsRNA по п. 61, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

64. Средство на основе dsRNA по п. 61, где каждая нить независимо содержит 19-

30 нуклеотидов.

65. Средство на основе dsRNA по п. 61, где каждая нить независимо содержит 14-40 нуклеотидов.

66. Средство на основе dsRNA по п. 61, где смысловая нить содержит нарушающий термостабильность нуклеотид, помещенный в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити.

67. Средство на основе dsRNA по п. 66, где нарушающая термостабильность модификация выбрана из модификации с удалением азотистого основания; ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в дуплексе и дестабилизирующей модификации сахара.

68. Выделенная клетка, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-67.

69. Фармацевтическая композиция для подавления экспрессии гена, кодирующего HMGB1, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-67.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1-67 и липид.

71. Способ подавления экспрессии гена HMGB1 в клетке, при этом способ предусматривает приведение клетки в контакт со средством на основе dsRNA по любому из пп. 1-67 или фармацевтической композицией по п. 69 или п. 70, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена HMGB1 в клетке.

72. Способ по п. 71, где клетка находится в организме субъекта.

73. Способ по п. 72, где субъектом является субъект-человек.

74. Способ по п. 73, где субъект имеет связанное с HMGB1 нарушение.

75. Способ по п. 74, где связанное с HMGB1 нарушение выбрано из группы, состоящей из воспаления печени, фиброза печени, повреждения печени, связанного с повышенным уровнем HMGB1, метаболического нарушения, показателя кровяного давления, равного или превышающего 130/85 мм рт. ст., повышенного уровня глюкозы в крови натощак, составляющего по меньшей мере 100 мг/дл, большой окружности талии (40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин); соотношения талии и бедер $< 1,0$ (для мужчин) или $< 0,8$ (для женщин); низкого уровня холестерина HDL (ниже 40 мг/дл для мужчин и ниже 50 мг/дл для женщин), уровня триглицеридов, составляющего по меньшей мере 150 мг/дл, NAFLD, стеатогепатита, NASH, цирроза при NASH, криптогенного цирроза, гипертензии, гиперхолестеринемии, инфекции печени, печеночного воспаления, цирроза, аутоиммунного гепатита, длительного употребления алкоголя, алкогольного гепатита, алкогольного стеатогепатита, гемохроматоза и длительного применения фармацевтических средств, которые вызывают повреждение печени.

76. Способ по п. 74, где связанное с HMGB1 нарушение представляет собой метаболическое нарушение.

77. Способ по п. 74, где связанное с HMGB1 нарушение представляет собой

NAFLD.

78. Способ по любому из пп. 71-77, где экспрессия HMGB1 подавляется на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или до уровня, который ниже уровня обнаружения в анализе по сравнению с клеткой, не приведенной в контакт со средством на основе dsRNA.

79. Способ по любому из пп. 73-77, где подавление экспрессии HMGB1 приводит к снижению уровня белка HMGB1 в сыворотке крови субъекта на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

80. Способ лечения связанного с HMGB1 нарушения у субъекта, предусматривающий введение субъекту средства на основе dsRNA по любому из пп. 1-67 или фармацевтической композиции по п. 69 или п. 70, за счет чего осуществляется лечение связанного с HMGB1 нарушения у субъекта.

81. Способ по п. 80, где связанное с HMGB1 нарушение выбрано из группы, состоящей из воспаления печени, фиброза печени, повреждения печени, связанного с повышенным уровнем HMGB1, метаболического нарушения, показателя кровяного давления, равного или превышающего 130/85 мм рт. ст., повышенного уровня глюкозы в крови натощак, составляющего по меньшей мере 100 мг/дл, большой окружности талии (40 дюймов или больше для мужчин и 35 дюймов или больше для женщин); соотношения талии и бедер $< 1,0$ (для мужчин) или $< 0,8$ (для женщин); низкого уровня холестерина HDL (ниже 40 мг/дл для мужчин и ниже 50 мг/дл для женщин), уровня триглицеридов, составляющего по меньшей мере 150 мг/дл, NAFLD, стеатогепатита, NASH, цирроза при NASH, криптогенного цирроза, гипертензии, гиперхолестеринемии, инфекции печени, печеночного воспаления, цирроза, аутоиммунного гепатита, длительного употребления алкоголя, алкогольного гепатита, алкогольного стеатогепатита, гемохроматоза и длительного применения фармацевтических средств, которые вызывают повреждение печени.

82. Способ по п. 81, где связанное с HMGB1 нарушение представляет собой метаболическое нарушение.

83. Способ по п. 81, где связанное с HMGB1 нарушение представляет собой NAFLD.

84. Способ по п. 80, где субъектом является субъект-человек.

85. Способ по любому из пп. 80-84, где средство на основе dsRNA вводят субъекту в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

86. Способ по любому из пп. 80-84, где средство на основе dsRNA вводят субъекту подкожно.

87. Способ по любому из пп. 80-85, где у субъекта измеряют уровень HMGB1.

88. Способ по п. 86, где уровень HMGB1 представляет собой уровень белка HMGB1 в образце крови или сыворотки крови субъекта или уровень РНК HMGB1 в образце крови или мочи.

89. Способ по п. 88, где РНК в образце крови или мочи анализируют в отношении

сайта расщепления siRNA.

По доверенности