

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191630** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.11.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.09

(54) **ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/777,677

(32) 2018.12.10

(33) US

(86) PCT/US2019/065294

(87) WO 2020/123410 2020.06.18

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Мюррей Джастин К., У Бинь, Чэн
Юань, Херберич Брэдли Дж. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к химически модифицированным конструкциям для RNAi, предназначенным для снижения экспрессии целевого гена. В частности, настоящее изобретение относится к специфическим паттернам из модифицированных нуклеотидов, подлежащих встраиванию в конструкции для RNAi для улучшения их стабильности и эффективности *in vivo*. Также описаны фармацевтические композиции, содержащие химически модифицированные конструкции для RNAi, и способы подавления экспрессии целевого гена *in vivo* путем введения химически модифицированных конструкций для RNAi, например, для лечения или уменьшения интенсивности различных болезненных состояний.

202191630
A1

202191630

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569146EA/032

ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi И ПУТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/777677, поданной 10 декабря 2018 года, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте.

ОПИСАНИЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[2] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте. Копия перечня последовательностей в машиночитаемой форме, которая была создана 9 декабря 2019 года, называется A-2327-WO-PCT_SeqList_ST25 и имеет размер 24,7 килобайта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[3] Настоящее изобретение относится к химически модифицированным конструкциям для RNAi, предназначенным для снижения экспрессии целевого гена *in vivo*. В частности, настоящее изобретение относится к специфическим паттернам из модифицированных нуклеотидов, которые придают улучшенную эффективность и стабильность конструкциям для RNAi *in vivo*. Такие конструкции для RNAi применимы для подавления экспрессии целевого гена в терапевтических целях.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] РНК-интерференция (RNAi) представляет собой посттранскрипционный механизм сайленсинга генов, который обнаруживается почти во всех таксономических группах и считается эволюционно-консервативным механизмом клеточной защиты (Fire *et al.*, Nature, Vol. 391; 806-811, 1998; Fire *et al.*, Trends Genet, Vol. 15: 358-363, 1999; и Hamilton and Baulcombe, Science, Vol. 286, 950-952, 1999). Физиологический механизм RNAi инициируется образованием дуплексов из 18-25 пар оснований, опосредованным ферментом Dicer, разрезающим более длинные некодирующие РНК. Эти короткие молекулы РНК загружаются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), где смысловая нить, или сопровождающая нить, отбрасывается, а антисмысловая нить, или направляющая нить, гибридизуется с полностью или частично комплементарной последовательностью мРНК (Nakanishi, Wiley Interdiscip. Rev. RNA, Vol. 7: 637-660, 2016). Затем индуцируется сайленсинг мРНК путем Ago2-опосредованной деградации или репрессии трансляции (Bobbin and Rossi, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., Vol. 56:103-122, 2016).

[5] Достижения в технологии RNAi и методологии доставки привели к растущему числу положительных результатов, полученных с применением видов терапии на основе RNAi. Такие виды терапии представляют собой многообещающий класс терапевтических средств, в частности, против мишеней, которые были признаны как “не поддающиеся

лечению” с помощью низкомолекулярных средств или биологических воздействий. Несмотря на то, что был достигнут большой прогресс в преодолении предрасположенности к метаболическим воздействиям, присущей природной РНК, за счет разработки химических модификаций и улучшенных способов доставки, в данной области техники остается потребность в средствах для RNAi с повышенной эффективностью и стабильностью *in vivo*, подходящих для введения в терапевтических целях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Настоящее изобретение частично основано на разработке паттернов химических модификаций, предназначенных для конструкций для RNAi, которые улучшают эффективность и/или продолжительность действия данных конструкций в отношении активности сайленсинга генов *in vivo*. Описанные в данном документе паттерны модификаций можно универсально применять к множеству конструкций для RNAi, имеющих разные последовательности и мишени. Конструкции для RNAi применимы для подавления экспрессии целевого гена *in vivo*, например, в терапевтических целях.

[7] Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены конструкции для RNAi, которые подавляют экспрессию последовательности целевого гена, где конструкции для RNAi содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, и где конструкции для RNAi содержат структуру, представленную одной из формул, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению имеют паттерн химических модификаций, выбранный из одного из паттернов, обозначенных P1-P30, как описано в данном документе.

[8] В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A):



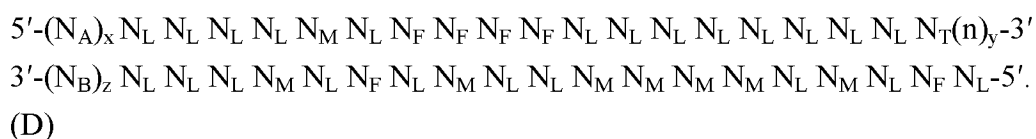
(A)

[9] В формуле (A) верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить; каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) и дезоксирибонуклеотида; каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-

алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида; и N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. X может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. Один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити. Y может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити. Z может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. Один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

[10] В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-23 нуклеотида и антисмысловую нить длиной 19-23 нуклеотида, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 7 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Конструкция для RNAi может иметь нуклеотидный липкий конец на одном или обоих 3'-концах смысловой нити и антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[11] В других вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D):



[12] В формуле (D) верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить; каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид; каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида; каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида; и N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. X может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. Один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити. Y может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов p являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити. Z может составлять целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида. Один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в

смысловой нити.

[13] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-23 нуклеотида и антисмысловую нить длиной 19-23 нуклеотида, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 10-13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Конструкция для RNAi может иметь нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. В качестве альтернативы конструкция для RNAi может иметь нуклеотидный липкий конец на 3'-концах как смысловой нити, так и антисмысловой нити.

[14] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере одну модификацию остова, такую как модифицированная межнуклеотидная или межнуклеозидная связь. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь. В конкретных вариантах осуществления фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут быть расположены на 3'- или 5'-концах смысловой и/или антисмысловой нитей.

[15] Конструкции для RNAi могут дополнительно содержать лиганд для облегчения доставки конструкций для RNAi в определенные ткани или клетки, такие как клетки печени, или захвата ими. В некоторых вариантах осуществления лиганд нацеливает доставку конструкций для RNAi в гепатоциты. В этих и других вариантах осуществления лиганд может содержать галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В определенных вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный галактозный или мультивалентный GalNAc-фрагмент, такой как трехвалентный или четырехвалентный галактозный или GalNAc-фрагмент. Лиганд может быть ковалентно присоединен к 5'- или 3'-концу смысловой нити конструкции для RNAi, необязательно через линкер. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат лиганд и линкер, имеющие структуру согласно любой из формул I-IX, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат лиганд и линкер, имеющие структуру согласно формуле VI. В другом варианте осуществления конструкции для RNAi содержат лиганд и линкер, имеющие структуру согласно формуле VII. В еще одном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат лиганд и линкер, имеющие структуру согласно формуле IX.

[16] В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие любую из конструкций для RNAi, описанных в данном

документе, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Такие фармацевтические композиции особенно применимы для снижения или подавления экспрессии целевого гена в клетках (например, клетках печени) субъекта, в частности, когда сверхэкспрессия продукта целевого гена у субъекта ассоциирована с патологическим фенотипом.

[17] В настоящее изобретение включены способы снижения или подавления экспрессии целевого гена в клетке, ткани или субъекте. В одном варианте осуществления способы включают приведение клетки или ткани в контакт с любой из конструкций для RNAi, описанных в данном документе. Клетка или ткань могут находиться в условиях *in vitro* или *in vivo*. В другом варианте осуществления способы включают введение субъекту любой из конструкций для RNAi, описанных в данном документе. Конструкции для RNAi можно вводить субъекту парентерально (например, внутривенно или подкожно).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[18] На **фиг. 1** показано несколько типичных вариантов осуществления паттернов химических модификаций, предназначенных для конструкций для RNAi. На каждой из схем верхняя нить представляет смысловую нить в направлении от 5' к 3', а нижняя нить представляет антисмысловую нить в направлении от 3' к 5'. Кружки со сплошной черной заливкой представляют 2'-О-метил (2'-OMe)-модифицированные нуклеотиды, кружки с полосатой заливкой представляют 2'-фтор (2'-F)-модифицированные нуклеотиды, а белые кружки представляют инвертированные нуклеотиды с удаленным азотистым основанием (*invAb*) или инвертированные дезоксирибонуклеотиды (*invdN*). Светло-серые линии, соединяющие кружки, представляют фосфодиэфирные связи, тогда как черные линии, соединяющие кружки, представляют фосфоротиоатные связи. Черные рамки обозначают предполагаемые сайты расщепления для Ago2 в пределах конструкций для RNAi.

[19] На **фиг. 2** представлена гистограмма уровней экспрессии варианта PNPLA3 человека в печени мышей, которым вводили инъекцией AAV, кодирующий вариант PNPLA3 человека, и обрабатывали с помощью подкожных инъекции 5 мг/кг указанной конструкции для RNAi, имеющей паттерн химических модификаций P1 или CM1. Экспрессию PNPLA3 человека измеряли с помощью qPCR и регистрировали как уровни экспрессии относительно таковых у животных, которых обрабатывали средой-носителем. Уровни экспрессии показаны на день 8 после введения конструкции для RNAi.

[20] На **фиг. 3** представлена гистограмма уровней экспрессии варианта PNPLA3 человека в печени мышей, которым вводили инъекцией AAV, кодирующий вариант PNPLA3 человека, и обрабатывали с помощью подкожных инъекций 5 мг/кг указанной конструкции для RNAi, имеющей паттерны химических модификаций P1, P2, P3 или P4. Экспрессию PNPLA3 человека измеряли с помощью qPCR и регистрировали как уровни экспрессии относительно таковых у животных, которых обрабатывали средой-носителем. Уровни экспрессии показаны на день 15 после введения конструкции для RNAi.

[21] На **фиг. 4A и 4B** представлены линейные графики, изображающие общий поток (фотонов в секунду) у мышей, получивших подкожные инъекции среды-носителя или

указанных конструкций для RNAi, имеющих паттерн химических модификаций P9, в дозе 1 мг/кг (**фиг. 4А**) или 3 мг/кг (**фиг. 4В**) в зависимости от числа недель после инъекции конструкции для RNAi. Общий поток представляет сигнал от экспрессируемого мышами репортерного гена люциферазы, который содержит последовательности, комплементарные последовательностям конструкций для RNAi. Снижение общего потока указывает на снижение экспрессии репортерного гена люциферазы.

[22] На **фиг. 5** представлена гистограмма уровней экспрессии варианта PNPLA3 человека в печени мышей, которым вводили инъекцией AAV, кодирующий вариант PNPLA3 человека, и обрабатывали с помощью подкожных инъекций 3 мг/кг указанных конструкций для RNAi, имеющих паттерны химических модификаций P9 (дуплексы №№ 7318 и 8709), CM2 (дуплекс № 8103), CM3 (дуплекс № 8104) или CM4 (дуплекс № 8105). Экспрессию PNPLA3 человека измеряли с помощью qPCR и регистрировали как уровни экспрессии относительно таковых у животных, которых обрабатывали средой-носителем. Уровни экспрессии показаны на день 28 после введения конструкции для RNAi.

[23] На **фиг. 6** представлена гистограмма уровней экспрессии ASGR1 мыши в печени мышей, обработанных с помощью подкожных инъекций 5 мг/кг указанных конструкций для RNAi ASGR1. Экспрессию ASGR1 мыши измеряли с помощью qPCR и регистрировали как уровни экспрессии, нормализованные по уровням экспрессии Gapdh. Уровни экспрессии показаны на день 4, день 8 и день 15 после введения конструкции для RNAi или буфера (фосфатно-солевой буфер, PBS).

[24] На **фиг. 7** представлен линейный график, показывающий процентное изменение уровней Lp(a) в сыворотке крови относительно исходного уровня у дважды трансгенных мышей, которым вводили подкожные инъекции 0,5 мг/кг указанных конструкций для RNAi, нацеленных на LPA. Обе конструкции для RNAi имели одинаковую последовательность и отличались только паттерном химических модификаций; у дуплекса № 3632 была комбинация модификаций CM1, а у дуплекса № 3635 была комбинация модификаций P1. Процентное изменение уровней Lp(a) в сыворотке крови показано на день 14 (D14) и день 28 (D28) после однократной подкожной инъекции конструкций для RNAi.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[25] Настоящее изобретение частично основано на разработке паттернов химических модификаций, предназначенных для конструкций для RNAi, которые приводят к эффективному и продолжительному нокдауну экспрессии целевого гена *in vivo* с охватом множества последовательностей и мишеней. Было показано, что химически модифицированные конструкции для RNAi, описанные в данном документе, обладают улучшенной эффективностью и/или продолжительностью действия в отношении активности сайленсинга гена *in vivo* по сравнению с ранее описанными терапевтическими средствами для RNAi, имеющими альтернативные паттерны химических модификаций. Модифицированные конструкции для RNAi по настоящему изобретению применимы для подавления экспрессии целевого гена *in vivo*, например, для лечения или уменьшения интенсивности различных болезненных состояний. Соответственно, в настоящем

изобретении предусмотрены конструкции для RNAi, которые подавляют экспрессию последовательности целевого гена.

[26] Используемый в данном документе термин “конструкция для RNAi” относится к средству, содержащему молекулу РНК, которая способна снижать экспрессию целевого гена посредством механизма РНК-интерференции при введении в клетку. РНК-интерференция представляет собой процесс, при котором молекула нуклеиновой кислоты индуцирует расщепление и деградацию молекулы целевой РНК (например, молекулы матричной РНК или мРНК) специфичным во отношении последовательности образом, например благодаря пути с участием РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит молекулу двухнитевой РНК, содержащую две антипараллельные нити из смежных нуклеотидов, которые являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы гибридизоваться с образованием дуплексного участка. “Гибридизовать” или “гибридизация” относится к спариванию комплементарных полинуклеотидов, как правило, с помощью образования водородных связей (например, образования уотсон-криковских, хугстиновских или обратных хугстиновских водородных связей) между комплементарными основаниями в двух полинуклеотидах. Нить, содержащую участок, имеющий последовательность, которая практически полностью комплементарна целевой последовательности (например, целевой мРНК), называют “антисмысловой нитью”. “Смысловая нить” относится к нити, которая включает участок, который практически полностью комплементарен участку антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может содержать участок, имеющий последовательность, которая практически полностью идентична целевой последовательности.

[27] Молекула двухнитевой РНК может включать химические модификации рибонуклеотидов, в том числе модификации компонентов рибонуклеотидов, представляющих собой рибозный сахар, основание или остов, таких как те, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле двухнитевой РНК (например, siRNA, shRNA или т. п.), охватываются термином “двухнитевая РНК” для целей настоящего изобретения.

[28] Используемая в данном документе первая последовательность является “комплементарной” второй последовательности, если при определенных условиях, таких как физиологические условия, полинуклеотид, содержащий первую последовательность, может гибридизоваться с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, с образованием дуплексного участка. Другие такие условия могут включать умеренные или жесткие условия гибридизации, которые известны специалистам в данной области. Считается, что первая последовательность является полностью комплементарной (комплементарной на 100%) второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность, образует пары оснований с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей без каких-либо ошибочно спаренных оснований. Последовательность

является “практически полностью комплементарной” целевой последовательности, если эта последовательность комплементарна целевой последовательности на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%. Процент комплементарности может быть рассчитан путем деления числа оснований в первой последовательности, которые являются комплементарными основаниям в соответствующих положениях во второй или целевой последовательности, на общую длину первой последовательности. Можно также сказать, что последовательность является практически полностью комплементарной другой последовательности, если имеется не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных оснований на протяжении дуплексного участка из 30 пар оснований при гибридизации этих двух последовательностей. Как правило, если присутствуют какие-либо нуклеотидные липкие концы, определенные в данном документе, последовательность таких липких концов не учитывается при определении степени комплементарности между двумя последовательностями. Например, смысловая нить длиной 21 нуклеотид и антисмысловая нить длиной 21 нуклеотид, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка из 19 пар оснований с 2-нуклеотидными липкими концами на 3'-конце каждой нити, будут считаться полностью комплементарными в соответствии с тем, как данный термин используется в данном документе.

[29] В некоторых вариантах осуществления участок антисмысловой нити содержит последовательность, которая полностью комплементарна участку последовательности целевой гена (например, целевой мРНК). В таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити. В других таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая практически полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити, например, имеет 1, 2, 3, 4 или 5 ошибочно спаренных оснований в дуплексном участке, образованном смысловой и антисмысловой нитями. В определенных вариантах осуществления предпочтительно, чтобы любые ошибочно спаренные основания находились в терминальных участках (например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-концов нитей). В одном варианте осуществления любые ошибочно спаренные основания в дуплексном участке, образованном из смысловой и антисмысловой нитей, находятся в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца антисмысловой нити.

[30] В определенных вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевой РНК могут представлять собой две отдельные молекулы, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка, но в других случаях не связаны. Такие молекулы двухнитевой РНК, образуемые из двух отдельных нитей, называют “малыми интерферирующими РНК” или “короткими интерферирующими РНК” (siRNA). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению предусматривают siRNA.

[31] В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить,

которые гибридизуются с образованием дуплексного участка, могут быть частью единой молекулы РНК, т. е. смысловая и антисмысловая нити являются частью самокомплементарного участка единой молекулы РНК. В таких случаях единая молекула РНК содержит дуплексный участок (также называемый стеблевым участком) и петлевой участок. 3'-конец смысловой нити соединен с 5'-концом антисмысловой нити с помощью непрерывной последовательности из неспаренных нуклеотидов, которые будут образовывать петлевой участок. Петлевой участок, как правило, имеет длину, достаточную для того, чтобы молекула РНК могла завернуться сама на себя так, чтобы антисмысловая нить могла образовать пару оснований со смысловой нитью с образованием дуплекса или стеблевого участка. Петлевой участок может содержать от приблизительно 3 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 15 или от приблизительно 8 до приблизительно 12 неспаренных нуклеотидов. Такие молекулы РНК с по меньшей мере частично самокомплементарными участками обозначают как “короткие шпильковые РНК” (shRNA). В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению предусматривают shRNA. Длина одиночной по меньшей мере частично самокомплементарной молекулы РНК может составлять от приблизительно 40 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 45 нуклеотидов до приблизительно 85 нуклеотидов или от приблизительно 50 нуклеотидов до приблизительно 60 нуклеотидов, и она содержит дуплексный участок и петлевой участок, длина каждого из которых упоминается в данном документе.

[32] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая практически полностью или полностью комплементарна последовательности целевого гена. Последовательность целевого гена обычно относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит частичную или полную кодирующую последовательность для полипептида. Последовательность целевого гена может также включать некодирующий участок, такой как 5'- или 3'-нетранслируемый участок (UTR). В определенных вариантах осуществления последовательность целевого гена представляет собой последовательность матричной РНК (мРНК). Последовательность мРНК относится к любой последовательности матричной РНК, включая сплайс-варианты, кодирующие белок, варианты белка или изоформы от любых видов (например, мыши, крысы, отличного от человека примата, человека). В одном варианте осуществления последовательность целевого гена представляет собой последовательность мРНК, кодирующую белок человека. Последовательность целевого гена также может быть последовательностью РНК, отличной от последовательности мРНК, такой как последовательность тРНК, последовательность микроРНК или последовательность вирусной РНК.

[33] Участок антисмысловой нити конструкции для RNAi может быть практически полностью комплементарным или полностью комплементарным по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам из последовательности целевого гена. В некоторых

вариантах осуществления целевой участок последовательности гена, антисмысловая нить которого содержит участок комплементарности, может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 16 до приблизительно 28 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно 26 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 17 до приблизительно 24 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 30 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 последовательных нуклеотидов или от приблизительно 19 до приблизительно 21 последовательного нуклеотида.

[34] Смысловая нить конструкции для RNAi, как правило, содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, так что нити гибридизуются в физиологических условиях с образованием дуплексного участка. “Дуплексный участок” относится к участку в двух комплементарных или практически полностью комплементарных полинуклеотидах, которые образуют пары оснований друг с другом либо путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, либо посредством другого взаимодействия с образованием водородных связей, с созданием дуплекса между двумя полинуклеотидами. Длина дуплексного участка конструкции для RNAi должна быть достаточной, чтобы позволить конструкции для RNAi попасть в путь РНК-интерференции, например, путем взаимодействия с ферментом Dicer и/или комплексом RISC. Например, в некоторых вариантах осуществления длина дуплексного участка составляет от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. Также являются подходящими другие значения длины дуплексного участка в данном диапазоне, такие как от приблизительно 15 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 22 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 23 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 21 пары оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 25 пар оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 23 пар оснований или от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований. В одном варианте осуществления длина дуплексного участка составляет от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований. В другом варианте осуществления длина дуплексного участка составляет от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований. В определенных вариантах осуществления длина дуплексного участка составляет приблизительно 19 пар оснований. В других вариантах осуществления длина дуплексного участка составляет длину приблизительно 21 пары оснований.

[35] Для тех вариантов осуществления, в которых смысловая нить и антисмысловая нить являются двумя отдельными молекулами (например, конструкция для RNAi

предусматривает siRNA), смысловая нить и антисмысловая нить не должны быть такой же длины, как длина дуплексного участка. Например, одна или обе нити могут быть длиннее дуплексного участка и содержать один или несколько неспаренных нуклеотидов или ошибочно спаренных нуклеотидов, фланкирующих дуплексный участок. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Используемый в данном документе “нуклеотидный липкий конец” относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают за пределы дуплексного участка на терминальных концах нитей. Нуклеотидные липкие концы, как правило, образуются тогда, когда 3'-конец одной нити выступает за пределы 5'-конца другой нити или когда 5'-конец одной нити выступает за пределы 3'-конца другой нити. Длина нуклеотидного липкого конца обычно составляет от 1 до 6 нуклеотидов, от 1 до 5 нуклеотидов, от 1 до 4 нуклеотидов, от 1 до 3 нуклеотидов, от 2 до 6 нуклеотидов, от 2 до 5 нуклеотидов или от 2 до 4 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный липкий конец содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидный липкий конец содержит от 1 до 4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидный липкий конец содержит 2 нуклеотида. В определенных других вариантах осуществления нуклеотидный липкий конец содержит один нуклеотид.

[36] Нуклеотиды в составе липкого конца могут представлять собой рибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в составе липкого конца представляют собой 2'-модифицированные нуклеотиды (например 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды), дезоксирибонуклеотиды, инвертированные нуклеотиды (например, инвертированные нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, инвертированные дезоксирибонуклеотиды) или их комбинации. Например, в одном варианте осуществления нуклеотиды в составе липкого конца представляют собой дезоксирибонуклеотиды, например дезокситимидин. В другом варианте осуществления нуклеотиды в составе липкого конца представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-метоксиэтил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации. В других вариантах осуществления липкий конец содержит динуклеотид, представляющий собой 5'-уридин-уридин-3' (5'-UU-3'). В таких вариантах осуществления динуклеотид UU может содержать рибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, например 2'-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления липкий конец содержит динуклеотид, представляющий собой 5'-дезокситимидин-дезокситимидин-3' (5'-dTdT-3'). Когда нуклеотидный липкий конец присутствует в антисмысловой нити, нуклеотиды в составе липкого конца могут быть комплементарны последовательности целевого гена, образовывать ошибочное спаривание с последовательностью целевого гена или содержать какую-то другую последовательность (например, полипиримидиновую или полипуриновую последовательность, такую как UU, TT, AA, GG и т. д.).

[37] Нуклеотидный липкий конец может находиться на 5'-конце или 3'-конце одной или обеих нитей. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце и на 3'-конце смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 5'-конце смысловой нити и на 5'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити.

[38] Конструкции для RNAi могут содержать нуклеотидный липкий конец на одном конце молекулы двухнитевой РНК и тупой конец на другом. “Тупой конец” означает, что смысловая нить и антисмысловая нить полностью спарены по основаниям на конце молекулы и что неспаренные нуклеотиды, которые выступают за пределы дуплексного участка, отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити и тупой конец на 5'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и на 3'-конце смысловой нити. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит тупой конец на обоих концах молекулы двухнитевой РНК. В таких вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, и дуплексный участок имеет такую же длину, как смысловая и антисмысловая нити (т. е. молекула является двухнитевой по всей своей длине).

[39] Длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению может независимо составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно 28 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 21 нуклеотида, от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов или от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24 или приблизительно 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, но образуют дуплексный участок, который короче данных нитей, поэтому конструкция для RNAi содержит два нуклеотидных липки конца. К примеру, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит: (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, (ii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований, и (iii) нуклеотидные липкие концы из 2

неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит: (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iii) нуклеотидные липкие концы из 2 неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину и образуют дуплексный участок по всей их длине, поэтому на обоих липких концах двухнитевой молекулы отсутствуют нуклеотидные липкие концы. В одном таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит: (i) смысловую нить и антисмысловую нити, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований. В другом таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит: (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 23 пары оснований.

[40] В других вариантах осуществления смысловая нить или антисмысловая нить длиннее другой нити, и при этом две нити образуют дуплексный участок, длина которого равна длине более короткой нити, поэтому конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит: (i) смысловую нить длиной 19 нуклеотидов, (ii) антисмысловую нить длиной 21 нуклеотид, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований, и (iv) нуклеотидный липкий конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит: (i) смысловую нить длиной 21 нуклеотид, (ii) антисмысловую нить длиной 23 нуклеотида, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iv) нуклеотидный липкий конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[41] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению предпочтительно содержат модифицированные нуклеотиды. “Модифицированный нуклеотид” относится к нуклеотиду, который имеет одну или несколько химических модификаций нуклеозида, нуклеинового основания, пентозного кольца или фосфатной группы. Используемые в данном документе модифицированные нуклеотиды не охватывают рибонуклеотиды, содержащие аденозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат, уридинмонофосфат и цитидинмонофосфат. Однако конструкции для RNAi могут содержать комбинации модифицированных нуклеотидов и рибонуклеотидов. Встраивание модифицированных нуклеотидов в одну или обе нити молекул двухнитевых РНК может улучшать стабильность молекул РНК *in vivo*, например, за счет снижения восприимчивости молекул к действию нуклеаз и другим процессам деградации. Эффективность конструкций для RNAi в отношении снижения экспрессии целевого гена также можно усилить путем встраивания модифицированных нуклеотидов, в частности, когда они встроены в виде специфических паттернов, как более подробно описано в данном документе.

[42] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды имеют модификацию рибозного сахара. Данные модификации сахара могут включать модификации в 2'- и/или 5'-положении пентозного кольца, а также бициклические модификации сахара. “2'-модифицированный нуклеотид” относится к нуклеотиду, имеющему пентозное кольцо с заместителем в положении 2', отличным от ОН. Такие 2'-модификации включают без ограничения 2'-Н (например, дезоксирибонуклеотиды), 2'-О-алкил (например, О-С₁-С₁₀ или О-С₁-С₁₀замещенный алкил), 2'-О-аллил (О-СН₂СН=СН₂), 2'-С-аллил, 2'-дезоксид-2'-фтор (также называемый 2'-F или 2'-фтор), 2'-О-метил (ОСН₃), 2'-О-метоксиэтил (О-(СН₂)₂ОСН₃), 2'-ОСF₃, 2'-О(СН₂)₂ССН₃, 2'-О-аминоалкил, 2'-амино (например, NH₂), 2'-О-этиламин и 2'-азидо. Модификации в 5'-положении пентозного кольца включают без ограничения 5'-метил (R или S); 5'-винил и 5'-метокси.

[43] “Бициклическая модификация сахара” относится к модификации пентозного кольца, при которой мостик соединяет два атома кольца с образованием второго кольца, что приводит к образованию бициклической структуры сахара. В некоторых вариантах осуществления бициклическая модификация сахара содержит мостик между 4'- и 2'-атомами углерода пентозного кольца. Нуклеотиды, содержащие сахарный фрагмент с бициклической модификацией сахара, называются в данном документе “бициклическими нуклеиновыми кислотами” или BNA. Иллюстративные бициклические модификации сахара включают без ограничения α-L-метиленокси (4'-СН₂-О-2') бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA); β-D-метиленокси (4'-СН₂-О-2') BNA (также называемую закрытой нуклеиновой кислотой или LNA); этиленокси (4'-(СН₂)₂-О-2') BNA; аминокси (4'-СН₂-О-N(R)-2') BNA; оксиамино (4'-СН₂-N(R) -О-2') BNA; метил(метиленокси) (4'-СН(СН₃) -О-2') BNA (также называемую конформационно затрудненную этилом или cEt); метилен-тио (4'-СН₂-S-2') BNA; метилен-амино (4'-СН₂-N(R)-2') BNA; метилкарбоциклическую (4'-СН₂-СН(СН₃)-2') BNA; пропиленкарбоциклическую (4'-(СН₂)₃-2') BNA и метокси (этиленокси) (4'-СН(СН₂ОМе)-О-2') BNA (также называемую конформационно затрудненной МОЕ или cМОЕ). Эти и другие нуклеотиды с модифицированным сахаром, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 9181551, в публикации заявки на патент США № 2016/0122761, и в Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19: 937-954, 2012, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[44] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-алкил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-аллил-модифицированных нуклеотидов, бициклических нуклеиновых кислот (BNA), дезоксирибонуклеотидов или их комбинации. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации. В

определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации.

[45] Как смысловые, так и антисмысловые нити конструкций для RNAi могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В других вариантах осуществления все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных других вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити и все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В этих и других вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды могут представлять собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

[46] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды, встроенные в одну или обе нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению, имеют модификацию нуклеинового основания (также называемого в данном документе “основанием”). “Модифицированное нуклеиновое основание” или “модифицированное основание” относится к основанию, отличному от встречающихся в природе пуриновых оснований, аденина (A) и гуанина (G), и пиримидиновых оснований, тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные нуклеиновые основания могут быть синтетическими или встречающимися в природе модификациями и включают без ограничения универсальные основания, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин (X), гипоксантин (I), 2-аминоаденин, 6-метиладенин, 6-метилгуанин и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные 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-дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин.

[47] В некоторых вариантах осуществления модифицированное основание представляет собой универсальное основание. “Универсальное основание” относится к аналогу основания, который образует пары оснований неизбирательно со всеми природными основаниями в РНК и ДНК без изменения структуры двойной спирали у полученного дуплексного участка. Универсальные основания известны специалистам в данной области и включают без ограничения инозин, С-фенил, С-нафтил и другие ароматические производные, азолкарбоксамиды и нитроазольные производные, такие как

3-нитропиррол, 4-нитроиндол, 5-нитроиндол и 6-нитроиндол.

[48] Другие подходящие модифицированные основания, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, включают описанные в Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, Vol. 10: 297-310, 2000 и Peacock *et al.*, *J. Org. Chem.*, Vol. 76: 7295-7300, 2011, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил могут быть заменены другими нуклеиновыми основаниями, такими как модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше, без существенного изменения свойств спаривания оснований у полинуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такое замещенное нуклеиновое основание.

[49] В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити конструкций для RNAi могут содержать один или несколько нуклеотидов с удаленным азотистым основанием. “Нуклеотид с удаленным азотистым основанием” или “нуклеозид с удаленным азотистым основанием” представляют собой нуклеотид или нуклеозид, в которых отсутствует азотистое основание в 1'-положении рибозного сахара. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды с удаленным азотистым основанием встроены в терминальные концы смысловой и/или антисмысловой нитей конструкций для RNAi. В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотид с удаленным азотистым основанием в качестве терминального нуклеотида на своем 3'-конце, своем 5'-конце или на обоих своих 3'- и 5'-концах. В другом варианте осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотид с удаленным азотистым основанием в качестве терминального нуклеотида на своем 3'-конце, своем 5'-конце или на обоих своих 3'- и 5'-концах. В таких вариантах осуществления, в которых нуклеотид с удаленным азотистым основанием является терминальным нуклеотидом, он может представлять собой инвертированный нуклеотид, то есть связанным с соседним нуклеотидом через 3'-3' межнуклеотидную связь (когда он находится на 3'-конце нити) или через 5'-5' межнуклеотидную связь (когда он находится на 5'-конце нити), а не посредством природной 3'-5' межнуклеотидной связи. Нуклеотиды с удаленным азотистым основанием также могут включать модификацию сахара, такую как любая из модификаций сахара, описанных выше. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды с удаленным азотистым основанием содержат 2'-модификацию, такую как 2'-фтор-модификация, 2'-О-метил-модификация или 2'-Н (дезоксид)-модификация. В одном варианте осуществления нуклеотид с удаленным азотистым основанием содержит 2'-О-метил-модификацию. В другом варианте осуществления нуклеотид с удаленным азотистым основанием содержит 2'-Н-модификацию (т. е. дезоксинуклеотид с удаленным азотистым основанием).

[50] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что встраивание модифицированных нуклеотидов в конструкции для RNAi согласно определенными паттернам приводит к конструкциям для RNAi с улучшенной активностью сайленсинга гена *in vivo*. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить и антисмысловую нить, которые

содержат последовательности, являющиеся в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из по меньшей мере 15 пар оснований, где:

нуклеотиды в положениях 2, 7 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды;

нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и

каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

[51] В других вариантах осуществления конструкция для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить и антисмысловую нить, которые содержат последовательности, являющиеся в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из по меньшей мере 19 пар оснований, где:

нуклеотиды в положениях 2, 7 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды в положениях 4, 6, 10 и 12 (считая от 5'-конца) необязательно представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, и все другие нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, отличные от 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов; и

нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 3 и 5 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), необязательно представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и все другие нуклеотиды в смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, отличные от 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

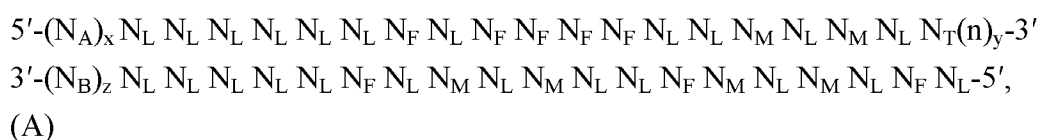
[52] В таких вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды, отличные от 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, могут быть выбраны из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-алкил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-аллил-модифицированных нуклеотидов, ВНА и дезоксирибонуклеотидов. В этих и других вариантах осуществления терминальный нуклеотид на 3'-конце, 5'-конце или на обоих 3'-конце и 5'-конце смысловой нити может представлять собой нуклеотид с удаленным азотистым основанием или дезоксирибонуклеотид. В таких вариантах осуществления нуклеотид с удаленным азотистым основанием или дезоксирибонуклеотид может быть инвертированным, т. е. связанным с соседним нуклеотидом через 3'-3' межнуклеотидную связь (когда он находится на 3'-конце нити) или через 5'-5' межнуклеотидную связь (когда он находится на 5'-конце нити), а не посредством природной 3'-5' межнуклеотидной связи.

[53] В любом из описанных выше вариантов осуществления нуклеотиды в

положениях 2, 7, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 7, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 10, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В альтернативных вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 7, 10, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В определенных других вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 2, 4, 7, 10, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

[54] В любом из описанных выше вариантов осуществления нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 3, 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 5, 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 3, 5, 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

[55] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая является в достаточной степени комплементарной последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного

нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

[56] В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), на 3'-конце смысловой нити имеется нуклеотидный липкий конец, т. е. y составляет 1, 2, 3 или 4. В одном таком варианте осуществления y составляет 2. В вариантах осуществления, в которых на 3'-конце смысловой нити имеется липкий конец из 2 нуклеотидов (т. е. y составляет 2), x составляет 0 и z составляет 2 или x составляет 1 и z составляет 2. В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), конструкция для RNAi содержит тупой конец на 3'-конце смысловой нити и 5'-конце

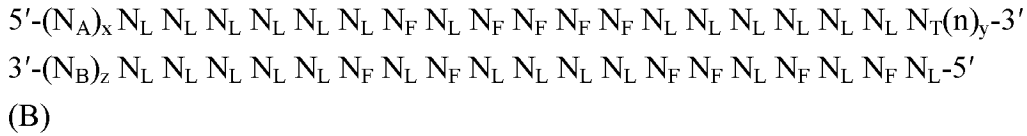
антисмысловой нити (т. е. y составляет 0). В таких вариантах осуществления, где нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити отсутствует (т. е. y составляет 0): (i) x составляет 2 и z составляет 4, (ii) x составляет 3 и z составляет 4, (iii) x составляет 0 и z составляет 2, (iv) x составляет 1 и z составляет 2 или (v) x составляет 2 и z составляет 2. В любом из вариантов осуществления, в которых x составляет больше 0, нуклеотид N_A , который является терминальным нуклеотидом на 5'-конце смысловой нити, может представлять собой инвертированный нуклеотид, такой как инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид.

[57] В определенных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), каждый N_M в положениях 4 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления каждый N_M в положениях 4, 6 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления каждый N_M в положениях 4, 6, 10 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В альтернативных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), каждый N_M в положениях 10 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В связанных вариантах осуществления N_M в положениях 4, 10 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, каждый представляют собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В других альтернативных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), N_M в положениях 4, 6 и 10 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, каждый представляют собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и N_M в положении 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), каждый N_M как в смысловой, так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[58] В любом из описанных выше вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A), каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловой нитях может представлять собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В этих вариантах осуществления и любом из вариантов осуществления, описанных выше, N_T в формуле (A) может представлять собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[59] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения

конструкция для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая достаточно комплементарна последовательности антисмысловой нити для образования дуплексного участка, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (B):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_L независимо представляет собой модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет собой модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

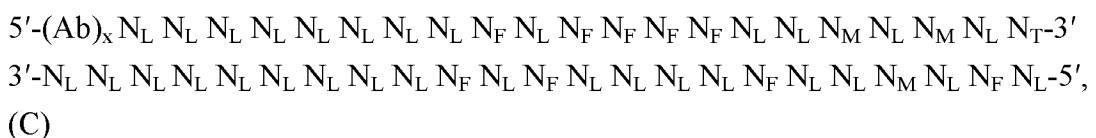
z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько

нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

[60] В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (B), на 3'-конце смысловой нити имеется нуклеотидный липкий конец, т. е. у составляет 1, 2, 3 или 4. В одном таком варианте осуществления у составляет 2. В вариантах осуществления, в которых на 3'-конце смысловой нити имеется липкий конец из 2 нуклеотидов (т. е. у составляет 2), х составляет 0 и z составляет 2 или х составляет 1 и z составляет 2. В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (B), конструкция для RNAi содержит тупой конец на 3'-конце смысловой нити и 5'-конце антисмысловой нити (т. е. у составляет 0). В таких вариантах осуществления, где нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити отсутствует (т. е. у составляет 0): (i) х составляет 2 и z составляет 4, (ii) х составляет 3 и z составляет 4, (iii) х составляет 0 и z составляет 2, (iv) х составляет 1 и z составляет 2 или (v) х составляет 2 и z составляет 2. В любом из вариантов осуществления, в которых х составляет больше 0, нуклеотид N_A , который является терминальным нуклеотидом на 5'-конце смысловой нити, может представлять собой инвертированный нуклеотид, такой как инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид.

[61] В любом из описанных выше вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (B), каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловых нитях может представлять собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В таких вариантах осуществления и любом из вариантов осуществления, описанных выше, N_T в формуле (B) может представлять собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[62] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (C):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида; и

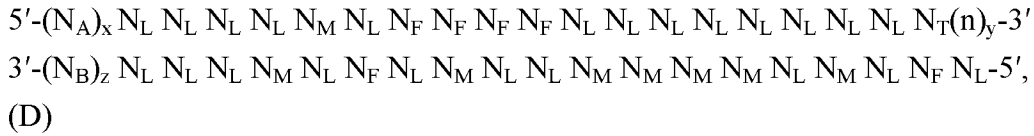
x составляет 0 или 1, и Ab представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием.

[63] В определенных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNA_i содержит структуру, представленную формулой (C), N_M в антисмысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В этих и других вариантах осуществления каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В альтернативных вариантах осуществления каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNA_i содержит структуру, представленную формулой (C), каждый N_M как в смысловой, так и в антисмысловых нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[64] В любом из описанных выше вариантов осуществления, в которых конструкция для RNA_i содержит структуру, представленную формулой (C), каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловых нитях может представлять собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В этих вариантах осуществления и любом из вариантов осуществления, описанных выше, N_T в формуле (C) может представлять собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. Например, в одном варианте осуществления N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид, и x составляет 0. В другом варианте осуществления N_T представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и x составляет 1. В еще одном варианте осуществления N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид, и x составляет 1.

[65] В определенных вариантах осуществления конструкция для RNA_i по настоящему изобретению содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где

антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

[66] В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), на 3'-конце смысловой нити имеется нуклеотидный липкий конец, т. е. y составляет 1, 2, 3 или 4. В одном таком варианте осуществления y составляет 2. В вариантах осуществления, в которых на 3'-конце смысловой нити имеется липкий конец из 2 нуклеотидов (т. е. y составляет 2), x составляет 0 и z составляет 2 или x составляет 1 и z составляет 2. В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), конструкция для RNAi содержит тупой конец на 3'-конце смысловой нити и 5'-конце антисмысловой нити (т. е. y составляет 0). В таких вариантах осуществления, где нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити отсутствует (т. е. y составляет 0): (i) x составляет 2 и z составляет 4, (ii) x составляет 3 и z составляет 4, (iii) x составляет 0 и z составляет 2, (iv) x составляет 1 и z составляет 2 или (v) x составляет 2 и z составляет 2. В любом из вариантов осуществления, в которых x составляет больше 0, нуклеотид N_A , который является терминальным нуклеотидом на 5'-конце смысловой нити, может представлять собой инвертированный нуклеотид, такой как инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид.

[67] В определенных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления каждый N_M в положениях 4 и 6 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7-9 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В других вариантах осуществления каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В альтернативных вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 16 в антисмысловой нити,

считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В определенных других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), каждый N_M в положениях 7, 8, 9 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 4, 6 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В этих и других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид. В альтернативных вариантах осуществления N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[68] В любом из описанных выше вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D), каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловой нитях может представлять собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид. В этих вариантах осуществления и любом из вариантов осуществления, описанных выше, N_T в формуле (D) может представлять собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

[69] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению также могут содержать одну или несколько модифицированных межнуклеотидных связей. Используемый в данном документе термин “модифицированная межнуклеотидная связь” относится к межнуклеотидной связи, отличной от природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфорсодержащую межнуклеотидную связь, такую как фосфотриэфирная, аминоалкилфосфотриэфирная, алкилфосфонатная (например, метилфосфонатная, 3'-алкиленфосфонатная), фосфинатная, фосфорамидатная (например, 3'-аминофосфорамидатная и аминоалкилфосфорамидатная), фосфоротиоатная (P=S), хиральная фосфоротиоатная, фосфородитиоатная, тионофосфорамидатная, тионоалкилфосфонатная, тионоалкилфосфотриэфирная и боранофосфатная. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой 2'-5'-фосфодиэфирную связь. В других вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой не содержащую фосфор межнуклеотидную связь и, таким образом, может упоминаться как модифицированная межнуклеозидная связь. Такие не содержащие фосфор связи включают без ограничения морфолиновые связи (образуемые частично за счет сахарной части нуклеозида); силоксановые связи (-O-Si(H)₂-O-); сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые связи; ацетильные и тиоацетильные связи; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленметиляминовые (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-) и метиленгидразиновые связи; сульфонатные и сульфонамидные связи; амидные связи и другие связи, имеющие смешанные составные части из N, O, S и CH₂. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой пептидную связь

(например, аминоэтилглицин) для создания пептидной нуклеиновой кислоты или PNA, такой как описанные в патентах США №№ 5539082; 5714331 и 5719262. Другие подходящие модифицированные межнуклеотидные и межнуклеозидные связи, которые могут быть использованы в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 6693187, патенте США № 9181551, в публикации заявки на патент США № 2016/0122761 и в Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19: 937-954, 2012, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[70] В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут присутствовать в смысловой нити, антисмысловой нити или в обеих нитях конструкции для RNAi. К примеру, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В еще одних вариантах осуществления обе нити содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Конструкции для RNAi могут содержать одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце, 5'-конце, или как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. К примеру, в определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфоротиоатных межнуклеотидных связей на 5'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей.

[71] В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между терминальными нуклеотидами на 3'-конце смысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами на 3'-конце смысловой нити. В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между терминальными нуклеотидами на 3'-конце смысловой нити и одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между терминальными нуклеотидами на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами на 3'-конце антисмысловой нити (т. е. фосфоротиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидных связей на 3'-конце антисмысловой нити). В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными

нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами на 3'-конце смысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и две последовательных фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити (т. е. фосфоротиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидной связей как на 5'-, так и на 3'-концах антисмысловой нити и фосфоротиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидной связях как на 5'-, так и на 3'-концах смысловой нити). В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах антисмысловой нити и одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между терминальными нуклеотидами на 3'-конце смысловой нити. В любом из вариантов осуществления, в котором одна или обе нити содержат одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, остальные межнуклеотидные связи в пределах нитей могут представлять собой природные 3'-5'-фосфодиэфирные связи. Например, в некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеотидная связь смысловой и антисмысловой нитей выбрана из фосфодиэфирной и фосфоротиоатной, где по меньшей мере одна межнуклеотидная связь является фосфоротиоатной.

[72] В вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец, два или более неспаренных нуклеотида в составе липкого конца могут быть соединены посредством фосфоротиоатной межнуклеотидной связи. В определенных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 3'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В других вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 5'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В еще одних вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в любом нуклеотидном липком конце соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями.

[73] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут иметь любой из паттернов химических модификаций P1-P30, изображенных на фиг. 1. К примеру, в некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-23 нуклеотида и антисмысловую нить длиной 19-23 нуклеотида, где

последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 7 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов; и конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-концах смысловой нити и антисмысловой нити.

[74] В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и 3'-конце антисмысловой нити.

[75] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 8 и 10-13 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-7, 9 и 14-22 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 20 и 21 и между нуклеотидами в положениях 21 и 22 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-

метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити.

[76] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8, 9, 11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и 3'-конце антисмысловой нити.

[77] В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8, 9, 11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и

2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и 3'-конце антисмысловой нити.

[78] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и 3'-конце антисмысловой нити.

[79] В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-21 нуклеотид и антисмысловую нить длиной 21-23 нуклеотида, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 7 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 8-11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов; и конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити/3'-конце смысловой нити.

[80] В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[81] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 10 и 12-15 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-9, 11 и 16-22 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 20 и 21 и между нуклеотидами в положениях 21 и 22 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[82] В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[83] В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положениях 1 и 22; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 10 и 12-15 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-9, 11 и 16-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 21 и 22;

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[84] В одном конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 19 нуклеотидов;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-19 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 17 и 18 и между нуклеотидами в положениях 18 и 19 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[85] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 19 нуклеотидов;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-18 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 19 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 17 и 18 и между нуклеотидами в положениях 18 и 19 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[86] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[87] В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 10 и 12-15 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-9, 11 и 16-22 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 20 и 21 и между нуклеотидами в положениях 21 и 22;

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[88] В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 6, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[89] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9, 11-14, 17 и 19; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10, 15, 16, 18 и 20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 6, 8-11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[90] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 19 нуклеотидов;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-18 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 19 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 18 и 19 и необязательно между нуклеотидами в положениях 17 и 18 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[91] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 8, 9, 11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[92] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8, 9, 11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[93] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9, 11-14, 17 и 19; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10, 15, 16, 18 и 20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8, 9, 11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[94] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 7, 10, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 13 и 15-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[95] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-23 нуклеотида и антисмысловую нить длиной 19-23 нуклеотида, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать

дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 10-13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. В таких вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити/3'-конце смысловой нити. В альтернативных вариантах осуществления конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-концах как смысловой нити, так и антисмысловой нити.

[96] В одном конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит: смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 8, 9, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 7, 10-13, 15 и 17-23 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[97] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и

21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-13, 15 и 17-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[98] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7 и 9-12; 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6, 8 и 13-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 23 нуклеотида;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 7-13, 15 и 17-23 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[99] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 19 нуклеотидов;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 5 и 7-10; 2'-О-метил-

модифицированные нуклеотиды в положениях 1-4, 6 и 11-18 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 19 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 18 и 19 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 4, 6, 8, 9, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3, 5, 7, 10-13, 15 и 17-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[100] В другом конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 20 нуклеотидов;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 8-11 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-7 и 12-20 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 18 и 19 и между нуклеотидами в положениях 19 и 20 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-13, 15 и 17-21 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

[101] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 8-11 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-7 и 12-22 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 20 и 21 и между нуклеотидами в положениях 21 и 22 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 14 и 16 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-13, 15 и 17-21 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити.

[102] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-23 нуклеотида и антисмысловую нить длиной 19-23 нуклеотида, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где: нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 10-13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца), представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов; и конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-концах смысловой нити и антисмысловой нити.

[103] К примеру, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7-10 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-6 и 11-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити.

[104] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 22 нуклеотида;

инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 1; 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 8-11 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 2-7 и 12-22 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 20 и 21 и между нуклеотидами в положениях 21 и 22 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет нуклеотидный липкий конец, содержащий 2 нуклеотида, на 3'-конце смысловой нити и нуклеотидный липкий конец, содержащий 1-2 нуклеотида, на 3'-конце антисмысловой нити.

[105] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция для RNAi содержит смысловую нить длиной 19-21 нуклеотид и антисмысловую нить длиной 19-21 нуклеотид, где последовательности антисмысловой нити и смысловой нити являются в достаточной степени комплементарными друг другу, чтобы образовать дуплексный участок из 19-21 пары оснований, где нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца) представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; нуклеотиды в смысловой нити в положениях, спаренных с положениями 10, 11 и 13 в антисмысловой нити (считая от 5'-конца),

представляют собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды; и каждая из смысловой нити и антисмысловой нити суммарно содержит не более 7 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. В одном таком варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9 и 11-14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8, 10 и 15-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет два тупых конца.

[106] В другом таком варианте осуществления конструкция для RNAi содержит:

смысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 9-12 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1-8 и 13-20 и инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид в положении 21 (считая от 5'-конца) и

фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

и

антисмысловую нить, имеющую:

длину 21 нуклеотид;

2'-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 7, 12 и 14 и 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды в положениях 1, 3-6, 8-11, 13 и 15-21 (считая от 5'-конца)

и

фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 19 и 20 и между нуклеотидами в положениях 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где конструкция для RNAi имеет два тупых конца.

[107] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения 5'-конец смысловой нити, антисмысловой нити или как антисмысловой, так и смысловой нити конструкций для RNAi содержит фосфатный фрагмент. Используемый в данном документе термин “фосфатный фрагмент” относится к терминальной фосфатной группе, которая включает немодифицированные фосфаты (-O-P=O)(OH)OH), а также модифицированные фосфаты. Модифицированные фосфаты включают фосфаты, в которых одна или несколько групп O и OH заменены на H, O, S, N(R) или алкил, где R представляет собой H, аминоксигруппу или незамещенный или замещенный алкил. Иллюстративные фосфатные фрагменты включают без ограничения 5'-монофосфат; 5'-дифосфат; 5'-трифосфат; 5'-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный); 5'-аденозиновый кэп или любую другую структуру, представляющую собой модифицированный или немодифицированный нуклеотидный кэп; 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат); 5'-альфа-тиотрифосфат; 5'-гамма-тиотрифосфат; 5'-фосфорамидаты; 5'-винилфосфаты; 5'-алкилфосфонаты (например, алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т. д.) и 5'-алкилэфирфосфонаты (например, алкиловый эфир=метоксиметил, этоксиметил и т. д.).

[108] Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, могут иметь более одной химической модификации из описанных в данном документе. Например, модифицированный нуклеотид может иметь модификацию рибозного сахара, а также модификацию нуклеинового основания. В качестве примера модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара по 2'-положению (например, 2'-фтор или 2'-O-метил) и содержать модифицированное основание (например, 5-метилцитозин или псевдоурацил). В других вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара в сочетании с модификацией 5'-фосфата, что будет приводить к модифицированной межнуклеотидной или межнуклеозидной связи при встраивании модифицированного нуклеотида в полинуклеотид. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара, такую как 2'-фтор-модификация, 2'-O-метил-модификация или бициклическая модификация сахара, а также 5'-фосфоротиоатную группу. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одна или обе нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-модифицированных нуклеотидов или BNA и фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-O-метил-модифицированных нуклеотидов и фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

[109] В определенных вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой нити, считая от 5'-конца, в конструкциях для RNAi может предусматривать A, dA, dU, U или dT. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первых трех пар оснований от 5'-конца антисмысловой нити в пределах дуплексного

участка представляет собой пару оснований AU. В одном конкретном варианте осуществления первая пара оснований от 5'-конца антисмысловой нити в пределах дуплексного участка представляет собой пару оснований AU.

[110] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению можно легко получить с использованием методик, известных в данной области, например, с использованием обычного твердофазного синтеза нуклеиновых кислот. Полинуклеотиды конструкций для RNAi могут быть собраны в подходящем синтезаторе нуклеиновых кислот с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов (например, фосфорамидитов). Автоматизированные синтезаторы нуклеиновых кислот продаются коммерчески несколькими поставщиками, включая синтезаторы ДНК/РНК от Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния, США), синтезаторы MerMade от BioAutomation (Ирвинг, Техас, США) и синтезаторы OligoPilot от GE Healthcare Life Sciences (Питтсбург, Пенсильвания, США). Иллюстративный способ синтеза конструкций для RNAi по настоящему изобретению описан в примере 1.

[111] Для синтеза олигонуклеотидов посредством фосфорамидитной химии может использоваться 2'-силильная защитная группа в сочетании с кислотолабильным диметокситритилом (DMT) в 5'-положении рибонуклеозидов. Известно, что условия снятия защиты на конечном этапе не приводят к значительной деградации РНК-продуктов. Все процессы синтеза можно проводить в любом автоматическом или ручном синтезаторе в большом, среднем или малом масштабе. Процессы синтеза также можно проводить в многолуночных планшетах, колонках или на предметных стеклах.

[112] 2'-О-силильную группу можно удалить посредством воздействия фторид-ионов, которые могут включаться в любой источник фторид-иона, например, соли, содержащие фторид-ион в паре с неорганическими противоионами, например, фторид цезия и фторид калия, или соли, содержащие фторид-ион в паре с органическим противоионом, например, фторид тетраалкиламмония. В реакции снятия защиты в комбинации с неорганическим фторидом можно использовать краун-эфирный катализатор. Предпочтительными источниками фторид-иона являются фторид тетрабутиламмония или аминоксидофториды (например, объединение водного HF с триэтиламином в диполярном апротонном растворителе, например, диметилформамиде).

[113] Выбор защитных групп для использования на сложных фосфитных триэфирах и сложных фосфотриэфирах может менять устойчивость сложных триэфиров к действию фторида. Метильная защита сложного фосфотриэфира или сложного фосфитного триэфира может сделать связь устойчивой против фторид-ионов и увеличить технологический выход процесса.

[114] Поскольку рибонуклеозиды имеют реакционноспособный 2'-гидроксильный заместитель, может быть желательна защита реакционноспособного 2'-положения в РНК с помощью защитной группы, которая будет ортогональна 5'-О-диметокситритильной защитной группе, например, группа, устойчивая к обработке кислотой. Силильные защитные группы соответствуют этому критерию и могут быть легко удалены на конечной

стадии снятия защиты с помощью фторида, что может приводить к минимальной деградации РНК.

[115] В стандартной реакции фосфорамидитного сочетания можно использовать тетразольные катализаторы. Предпочтительные катализаторы включают, например, тетразол, S-этил-тетразол, бензилтиотетразол, п-нитрофенилтетразол.

[116] Как может быть понятно специалисту в данной области, дополнительные способы синтеза конструкций для RNAi, описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области. Кроме того, для получения требуемых соединений различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативной последовательности или порядке. Другие превращения в рамках синтетической химии, защитные группы (например, для гидроксила, амина и т. д., присутствующие на основаниях) и методология защитных групп (обеспечение защиты и снятие защиты), применимые при синтезе конструкций для RNAi, описанных в данном документе, известны из уровня техники и включают, например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) и их последующие издания. Синтез средств для RNAi на заказ также доступен от нескольких коммерческих поставщиков, включая Dharmacon, Inc. (Лафайет, Колорадо, США), AxoLabs GmbH (Кульмбах, Германия) и Ambion, Inc. (Фостер-Сити, Калифорния, США).

[117] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать лиганд. Используемый в данном документе “лиганд” относится к любому соединению или любой молекуле, которые способны напрямую или опосредованно взаимодействовать с другим соединением или молекулой. Взаимодействие лиганда с другим соединением или молекулой может вызывать биологический ответ (например, инициировать каскад передачи сигнала, индуцировать опосредованный рецептором эндоцитоз) или может представлять собой просто физическую ассоциацию. Лиганд может модифицировать одно или несколько свойств молекулы двухнитевой РНК, к которой он присоединен, таких как свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, абсорбции, распределения в клетках, захвата клеткой, заряда и/или клиренса молекулы РНК.

[118] Лиганд может предусматривать белок сыворотки крови (например, человеческий сывороточный альбумин, липопротейн низкой плотности, глобулин), холестеринный фрагмент, витамин (биотин, витамин E, витамин B₁₂), фолатный фрагмент, стероид, желчную кислоту (например, холевую кислоту), жирную кислоту (например, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту), углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту), гликозид, фосфолипид или антитело или его связывающий фрагмент (например, антитело или связывающий фрагмент, которые нацеливают конструкцию для RNAi на специфический тип клеток, такой как клетки печени). Другие примеры лигандов включают красители,

интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы (например, адамантануксусную кислоту, 1-пиренбутировую кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, О3-(олеил)литохолевую кислоту, О3-(олеил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин), пептиды (например, пептид *antennapedia*, пептид Tat, пептиды RGD), алкилирующие средства, полимеры, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ-40К), полиаминокислоты и полиамины (например, спермин, спермидин).

[119] В определенных вариантах осуществления лиганды обладают эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды содействуют лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой поликатионный пептид или пептидомиметик, который проявляет рН-зависимую активность в отношении мембраны и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический лиганд принимает свою функционально активную конформацию при значении рН, характерном для эндосомы. “Активная” конформация является конформацией, при которой эндосомолитический лиганд содействует лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao *et al.*, *Biochemistry*, Vol. 26: 2964-2972, 1987), пептид EALA (Vogel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118: 1581-1586, 1996) и их производные (Turk *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1559: 56-68, 2002). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая подвергается изменению заряда или протонированию в ответ на изменение рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

[120] В некоторых вариантах осуществления лиганд предусматривает липид или другую гидрофобную молекулу. В одном варианте осуществления лиганд предусматривает холестеринный фрагмент или другой стероид. Сообщалось, что конъюгированные с холестерином олигонуклеотиды были более активными, чем их неконъюгированные аналоги (Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, Vol. 12: 103-228, 2002). Лиганды, предусматривающие холестеринные фрагменты и другие липиды для конъюгации с молекулами нуклеиновой кислоты, также были описаны в патентах США №№ 7851615; 7745608 и 7833992, все из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. В другом варианте осуществления лиганд предусматривает фолатный фрагмент. Полинуклеотиды, конъюгированные с фолатными фрагментами, могут поглощаться клетками за счет опосредованного рецептором пути эндоцитоза. Такие

конъюгаты фолат-полинуклеотид описаны в патенте США № 8188247, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[121] Лиганд может нацеливать конструкцию для RNAi на специфическую ткань или тип клеток для избирательного подавления экспрессии целевого гена в этой специфической ткани или типе клеток. В одном варианте осуществления лиганд специфически нацеливает доставку конструкции для RNAi в клетки печени (например, гепатоциты) с использованием различных подходов, как более подробно описано ниже. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi нацелены на клетки печени с помощью лиганда, который связывается с экспрессируемым на поверхности асиалогликопротеиновым рецептором (ASGR) или его компонентом (например, ASGR1, ASGR2).

[122] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi могут специфически нацеливаться на печень за счет использования лигандов, которые связываются или взаимодействуют с белками, экспрессируемыми на поверхности клеток печени. К примеру, в определенных вариантах осуществления лиганды могут предусматривать антигенсвязывающие белки (например, антитела или их связывающие фрагменты (например, Fab, scFv)), которые специфически связываются с рецептором, экспрессируемым на гепатоцитах, таким как асиалогликопротеиновый рецептор и рецептор LDL. В одном конкретном варианте осуществления лиганд предусматривает антитело или его связывающий фрагмент, которые специфически связываются с ASGR1 и/или ASGR2. В другом варианте осуществления лиганд предусматривает Fab-фрагмент антитела, который специфически связывается с ASGR1 и/или ASGR2. “Fab-фрагмент” состоит из одной легкой цепи иммуноглобулина (т. е. вариабельной области (VL) и константной области (CL) легкой цепи) и области CH1 и вариабельной области (VH) одной тяжелой цепи иммуноглобулина. В другом варианте осуществления лиганд предусматривает одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (фрагмент scFv) из антитела, которое специфически связывается с ASGR1 и/или ASGR2. “Фрагмент scFv” содержит области VH и VL антитела, при этом данные области присутствуют в одной полипептидной цепи, и необязательно содержит пептидный линкер между областями VH и VL, что позволяет Fv образовать структуру, требуемую для связывания антигена. Иллюстративные антитела и их связывающие фрагменты, которые специфически связываются с ASGR1 и которые можно использовать в качестве лигандов для нацеливания конструкций для RNAi по настоящему изобретению на печень, описаны в WIPO-публикации № WO 2017/058944, которая настоящим включена посредством ссылки во всей своей полноте. Другие антитела или их связывающие фрагменты, которые специфически связываются с ASGR1, рецептором LDL или другими белками, экспрессируемыми на поверхности клеток печени, которые подходят для применения в качестве лигандов в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, являются коммерчески доступными.

[123] В определенных вариантах осуществления лиганд предусматривает углевод. “Углевод” относится к соединению, состоящему из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут

быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Углеводы включают без ограничения сахара (например, моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц) и полисахариды, такие как разновидности крахмала, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. В некоторых вариантах осуществления углеводов, встроенный в лиганд, представляет собой моносахарид, выбранный из пентозы, гексозы или гептозы, и ди- и трисахариды, включающие такие моносахаридные звенья. В других вариантах осуществления углеводов, встроенный в лиганд, представляет собой аминсахар, такой как галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин.

[124] В некоторых вариантах осуществления лиганд предусматривает гексозу или гексозамин. Гексоза может быть выбрана из глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы или фруктозы. Гексозамин может быть выбран из фруктозамина, галактозамина, глюкозамина или маннозамина. В определенных вариантах осуществления лиганд предусматривает глюкозу, галактозу, галактозамин или глюкозамин. В одном варианте осуществления лиганд предусматривает глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. В другом варианте осуществления лиганд предусматривает галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин. В конкретных вариантах осуществления лиганд предусматривает N-ацетилгалактозамин. Лиганды, предусматривающие глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин (GalNAc), особенно эффективны для нацеливания соединений на клетки печени, поскольку такие лиганды связываются с ASGR, экспрессируемым на поверхности гепатоцитов. См., например, D'Souza and Devarajan, J. Control Release, Vol. 203: 126-139, 2015. Примеры GalNAc- или галактозосодержащих лигандов, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патентах США №№ 7491805; 8106022 и 8877917; в публикации заявки на патент США № 20030130186 и WIPO-публикации № WO 2013166155, все из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[125] В определенных вариантах осуществления лиганд предусматривает мультивалентный углеводный фрагмент. Используемый в данном документе “мультивалентный углеводный фрагмент” относится к фрагменту, содержащему два или более углеводных звеньев, способных независимо связываться или взаимодействовать с другими молекулами. Например, мультивалентный углеводный фрагмент содержит два или более связывающих домена, состоящих из углеводов, которые могут связываться с двумя или более различными молекулами или двумя или более различными сайтами на одной и той же молекуле. Валентность углеводного фрагмента определяет число отдельных связывающих доменов в пределах углеводного фрагмента. К примеру, термины “одновалентный”, “двухвалентный”, “трехвалентный” и “четырёхвалентный”, относящиеся к углеводному фрагменту, относятся к углеводным фрагментам с одним, двумя, тремя и четырьмя связывающими доменами соответственно. Мультивалентный углеводный фрагмент может предусматривать мультивалентный лактозный фрагмент,

мультивалентный галактозный фрагмент, мультивалентный глюкозный фрагмент, мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент, мультивалентный N-ацетилглюкозаминовый фрагмент, мультивалентный маннозный фрагмент или мультивалентный фукозный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления лиганд предусматривает мультивалентный галактозный фрагмент. В других вариантах осуществления лиганд предусматривает мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент. В этих и других вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент может быть двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. В таких вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент может быть двухантенным или трехантенным. В одном конкретном варианте осуществления мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. В другом конкретном варианте осуществления мультивалентный галактозный фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. Иллюстративные трехвалентные и четырехвалентные GalNAc-содержащие лиганды для встраивания в конструкции для RNAi по настоящему изобретению подробно описаны ниже.

[126] Лиганд может быть присоединен или конъюгирован с молекулой РНК конструкции для RNAi напрямую или опосредованно. К примеру, в некоторых вариантах осуществления лиганд ковалентно напрямую присоединен к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi через линкер. Лиганд может быть присоединен к нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеотидным связям полинуклеотидов (например, смысловой нити или антисмысловой нити) конструкций для RNAi по настоящему изобретению. Конъюгация или присоединение к пуриновым нуклеиновым основаниям или их производным может происходить по любому положению, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В определенных вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеинового основания присоединены к лиганду. Конъюгация или присоединение к пиримидиновым нуклеиновым основаниям или их производными также может происходить по любому положению. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть присоединены к лиганду. Конъюгация или присоединение к сахарным фрагментам нуклеотидов может происходить по любому атому углерода. Иллюстративные атомы углерода сахарного фрагмента, которые могут быть присоединены к лиганду, включают атомы углерода в 2'-, 3'- и 5'-положениях. К лиганду также может быть присоединен атом в 1'-положении, в частности, в нуклеотиде с удаленным азотистым основанием. Межнуклеотидные связи также могут поддерживать прикрепление лиганда. В случае фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфорамидатной и т.п.) лиганд может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае аминокислотных или амидсодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) лиганд может быть присоединен к атому азота

амин или амида или к смежному атому углерода.

[127] В определенных вариантах осуществления лиганд может быть присоединен к 3'- или 5'-концу одной из смысловой или антисмысловой нитей. В определенных вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 5'-концу смысловой нити. В таких вариантах осуществления лиганд присоединен к 5'-терминальному нуклеотиду смысловой нити. В этих и других вариантах осуществления лиганд присоединен по 5'-положению 5'-терминального нуклеотида смысловой нити. В вариантах осуществления, в которых инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид представляет собой 5'-терминальный нуклеотид смысловой нити и он связан с соседним нуклеотидом через 5'-5'-межнуклеотидную связь, лиганд может быть присоединен по 3'-положению инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием или инвертированного дезоксирибонуклеотида. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 3'-концу смысловой нити. К примеру, в некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к 3'-терминальному нуклеотиду смысловой нити. В определенных таких вариантах осуществления лиганд присоединен по 3'-положению 3'-терминального нуклеотида смысловой нити. В вариантах осуществления, в которых инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид представляет собой 3'-терминальный нуклеотид смысловой нити и он связан с соседним нуклеотидом через 3'-3'-межнуклеотидную связь, лиганд может быть присоединен по 5'-положению инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием или инвертированного дезоксирибонуклеотида. В альтернативных вариантах осуществления лиганд присоединен вблизи 3'-конца смысловой нити, но перед одним или несколькими терминальными нуклеотидами (т. е. перед 1, 2, 3 или 4 терминальными нуклеотидами). В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен по 2'-положению сахара, входящего в состав 3'-терминального нуклеотида смысловой нити. В других вариантах осуществления лиганд присоединен по 2'-положению сахара, входящего в состав 5'-терминального нуклеотида смысловой нити.

[128] В определенных вариантах осуществления лиганд присоединен к смысловой или антисмысловой нити посредством линкера. “Линкер” представляет собой атом или группу атомов, которые ковалентно соединяют лиганд с полинуклеотидным компонентом конструкции для RNAi. Длина линкера может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 30 атомов, от приблизительно 2 до приблизительно 28 атомов, от приблизительно 3 до приблизительно 26 атомов, от приблизительно 4 до приблизительно 24 атомов, от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 7 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 8 до приблизительно 20 атомов, от приблизительно 8 до приблизительно 18 атомов, от приблизительно 10 до приблизительно 18 атомов и от приблизительно 12 до приблизительно 18 атомов. В некоторых вариантах осуществления линкер может предусматривать бифункциональный связывающий фрагмент, который обычно предусматривает алкильный фрагмент с двумя функциональными группами. Одна из функциональных групп выбрана для связывания с

представляющим интерес соединением (например, смысловой или антисмысловой нитью конструкции для RNAi), а другая выбрана для связывания с фактически любой выбранной группой, такой как лиганд, описанный в данном документе. В определенных вариантах осуществления линкер предусматривает структуру цепи или олигомер из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликоль или аминокислотные звенья. Примеры функциональных групп, которые обычно используются в бифункциональном связывающем фрагменте, включают без ограничения электрофилы для осуществления реакции с нуклеофильными группами и нуклеофилы для осуществления реакции с электрофильными группами. В некоторых вариантах осуществления бифункциональные связывающие фрагменты включают аминогруппу, гидроксильную группу, группу карбоновой кислоты, тиол, ненасыщенные группы (например, двойные или тройные связи) и т. п.

[129] Линкеры, которые можно использовать для присоединения лиганда к смысловой или антисмысловой нити в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, включают без ограничения пирролидин, 8-амино-3,6-ди-оксаоктановую кислоту, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, 6-аминогексановую кислоту, замещенный C₁-C₁₀алкил, замещенный или незамещенный C₂-C₁₀алкенил или замещенный или незамещенный C₂-C₁₀алкинил. Предпочтительные группы заместителей для таких линкеров включают без ограничения гидроксил, амина, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тиоалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

[130] В определенных вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. Расщепляемый линкер представляет собой линкер, который в достаточной степени стабилен вне клетки, но который после попадания в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В некоторых вариантах осуществления в целевой клетке или при первом эталонном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных условий) расщепляемый линкер расщепляется в по меньшей мере 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, чем в крови субъекта, или при втором эталонном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, наблюдаемых в крови или сыворотке крови).

[131] Расщепляемые линкеры восприимчивы к факторам расщепления, например, значению pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию молекул деструкции. Как правило, расщепляющие средства более распространены или обнаруживаются внутри клеток при более высоких уровнях или значениях активности, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких средств деструкции включают: окислительно-восстановительные средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительный расщепляемый линкер путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к

значению рН, составляющему пять или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемый кислотой линкер, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

[132] Расщепляемый линкер может содержать фрагмент, который чувствителен к рН. Значение рН сыворотки крови составляет 7,4, в то время как среднее значение внутриклеточного рН немного ниже, оно находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением рН, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую группу, которая расщепляется при предпочтительном значении рН, за счет чего молекула РНК освобождается от лиганда внутри клетки или в требуемом компартменте клетки.

[133] Линкер может включать расщепляемую группу, которая расщепляется под действием определенного фермента. Тип расщепляемой группы, встроенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, нацеливающие на печень лиганды могут быть связаны с молекулами РНК посредством линкера, который содержит сложноэфирную группу. Для клеток печени характерно высокое содержание эстераз, и следовательно линкер будет более эффективно расщепляться в клетках печени, а не в других типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз, включают клетки легких, коркового вещества почек и яичка. Линкеры, содержащие пептидные связи, могут быть использованы при нацеливании на клетки с высоким содержанием пептидаз, такие как клетки печени и синовиоциты.

[134] В целом пригодность кандидатного расщепляемого линкера может оцениваться путем тестирования способности средства (или условия) деструкции расщеплять кандидатный линкер. Также будет желательно протестировать кандидатный расщепляемый линкер в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при контакте с нецелевой тканью. Таким образом, можно определять относительную подверженность расщеплению при первом и втором условии, где первое условие выбрано так, что показывает расщепление в клетке-мишени, а второе условие выбрано так, что показывает расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке крови. Такую оценку можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на целых животных. Может быть полезно провести первоначальные оценки в условиях бесклеточных систем или культур и подтвердить результаты дальнейшими оценками на целых животных. В некоторых вариантах осуществления в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) применимые кандидатные линкеры расщепляются в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее по сравнению с расщеплением в крови или сыворотке крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

[135] В других вариантах осуществления используют окислительно-

восстановительные расщепляемые линкеры. Окислительно-восстановительные расщепляемые линкеры расщепляются при окислении или восстановлении. Примером группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатный расщепляемый линкер подходящим “линкером, расщепляемым при восстановлении” или, например, подходит ли он для использования с конкретной конструкцией для RNAi и конкретным лигандом, можно использовать один или несколько методов, описанных в данном документе. К примеру, кандидатный линкер можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством, известным в данной области техники, что имитирует скорость расщепления, которая будет наблюдаться в клетке, например, в целевой клетке. Кандидатные линкеры также можно оценивать в условиях, выбранных для имитации условий, характерных для крови или сыворотки крови. В специфическом варианте осуществления кандидатные линкеры расщепляются в крови на не более 10%. В других вариантах осуществления в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) применимые кандидатные линкеры расщепляются в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее по сравнению с расщеплением в крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

[136] В других вариантах осуществления для ковалентного присоединения лиганда к смысловой или бессмысловой нити конструкции для RNAi используют расщепляемые линкеры на основе фосфата, которые расщепляются под действием средств, которые расщепляют или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое гидролизует фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как внутриклеточные фосфатазы. Примерами расщепляемых групп на основе фосфата 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- и -O-P(S)(Rk)-S-, где Rk может представлять собой водород или алкил. Конкретные варианты осуществления включают -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-. Другим конкретным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Данные кандидатные линкеры могут оцениваться с использованием методов, аналогичных описанным выше.

[137] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые кислотой группы, которые представляют собой группы, расщепляемые в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые кислотой группы расщепляются в кислой среде при значении pH, составляющем приблизительно 6,5 или меньше (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или меньше), или под действием средств, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить среду для расщепления расщепляемых кислотой групп. Примеры расщепляемых кислотой

связывающих групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут характеризоваться общей формулой $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Специфическим вариантом осуществления является вариант, при котором атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (алкоксигруппы), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметил, пентил или трет-бутил. Данные кандидатные группы могут оцениваться с использованием методов, аналогичных описанным выше.

[138] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе сложных эфиров, которые расщепляются под действием ферментов, таких как внутриклеточные эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых групп на основе сложных эфиров включают без ограничения сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Данные кандидатные линкеры могут оцениваться с использованием методов, аналогичных описанным выше.

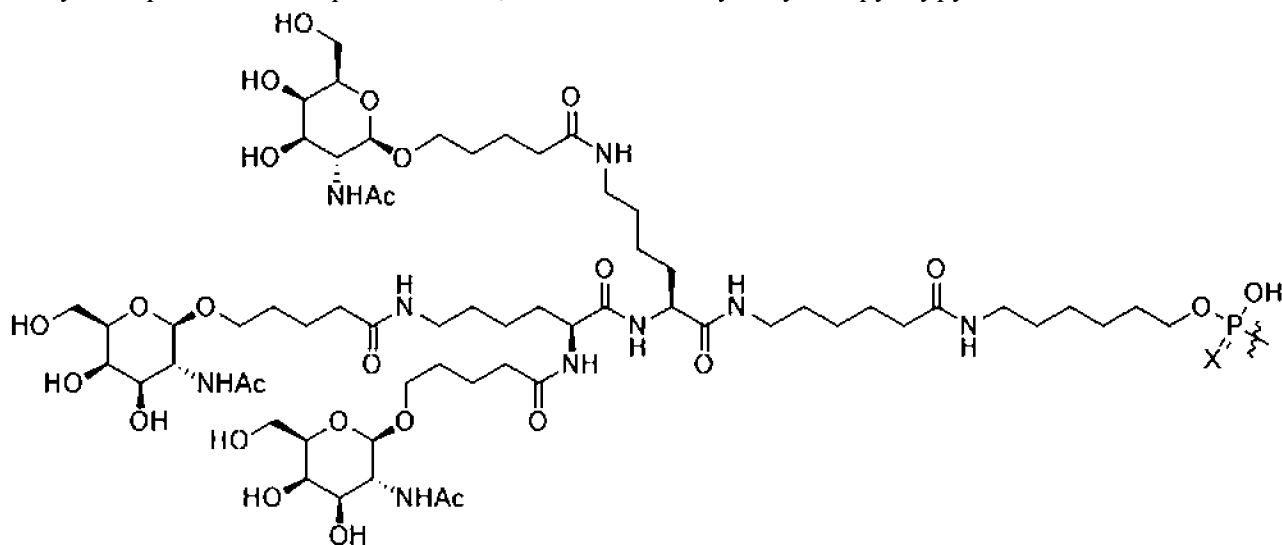
[139] В дополнительных вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе пептидов, которые расщепляются под действием таких ферментов, как внутриклеточные пептидазы и протеазы. Расщепляемые группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой специальный тип амидной связи, образуемой между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептидов обычно ограничивается пептидной связью (т. е. амидной связью), образуемой между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$, где R^A и R^B представляют собой боковые цепи двух смежных аминокислот. Данные кандидатные группы могут оцениваться с использованием методов, аналогичных описанным выше.

[140] Другие типы линкеров, подходящие для присоединения лигандов к смысловой или антисмысловой нитям в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, известны из уровня техники и могут включать линкеры, описанные в патентах США №№ 7723509; 8017762; 8828956; 8877917 и 9181551, все из которых настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[141] В определенных вариантах осуществления лиганд, ковалентно присоединенный к смысловой или антисмысловой нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению, содержит GalNAc-фрагмент, например мультивалентный GalNAc-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления мультивалентный GalNAc-фрагмент представляет собой трехвалентный GalNAc-фрагмент, и он присоединен к 3'-

концу смысловой нити. В других вариантах осуществления мультивалентный GalNAc-фрагмент представляет собой трехвалентный GalNAc-фрагмент, и он присоединен к 5'-концу смысловой нити. В еще одних вариантах осуществления мультивалентный GalNAc-фрагмент представляет собой четырехвалентный GalNAc-фрагмент, и он присоединен к 3'-концу смысловой нити. В еще одних вариантах осуществления мультивалентный GalNAc-фрагмент представляет собой четырехвалентный GalNAc-фрагмент, и он присоединен к 5'-концу смысловой нити.

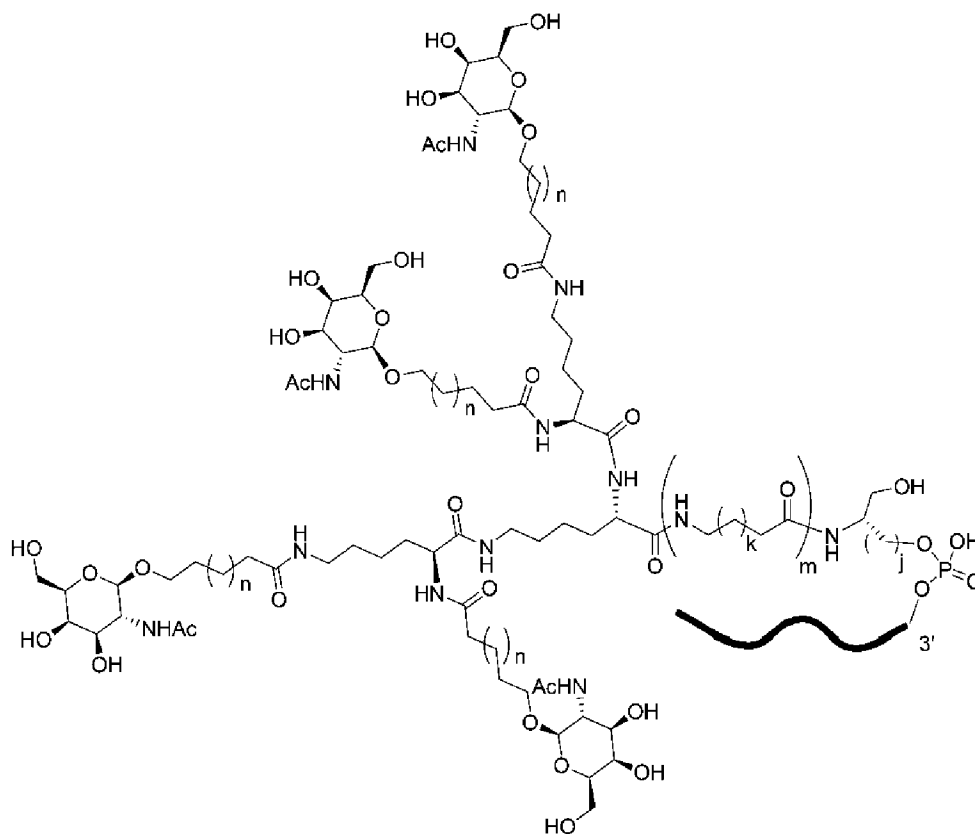
[142] В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат лиганд, имеющий следующую структуру:



В предпочтительных вариантах осуществления лиганд, имеющий такую структуру, ковалентно присоединен к 5'-концу смысловой нити через линкер, такой как линкеры, описанные в данном документе. В одном варианте осуществления линкер представляет собой аминоксильный линкер.

[143] Иллюстративные трехвалентные и четырехвалентные GalNAc-фрагменты и линкеры, которые могут быть присоединены к молекулам двухнитевой РНК в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, представлены в структурных формулах I-IX ниже. "Ac" в формулах, перечисленных в данном документе, представляет собой ацетильную группу.

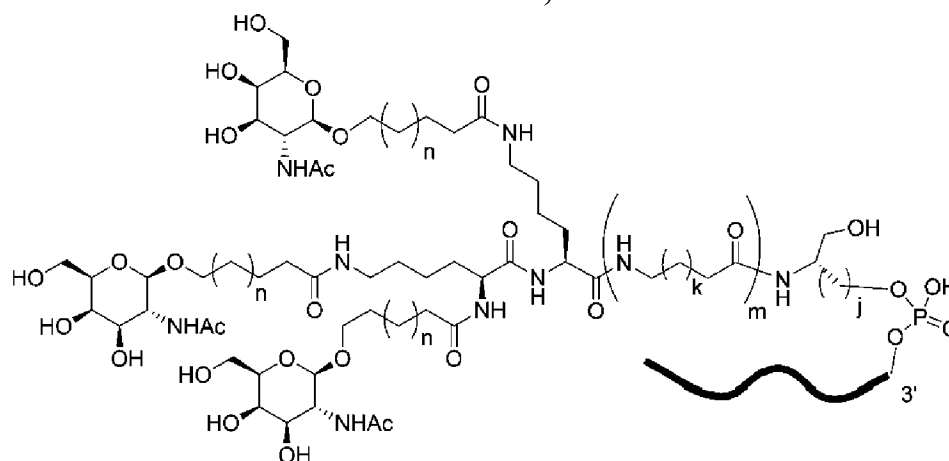
[144] В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы I, где каждый n независимо составляет 1-3, k составляет 1-3, m составляет 1 или 2, j составляет 1 или 2, и лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



ФОРМУЛА

I.

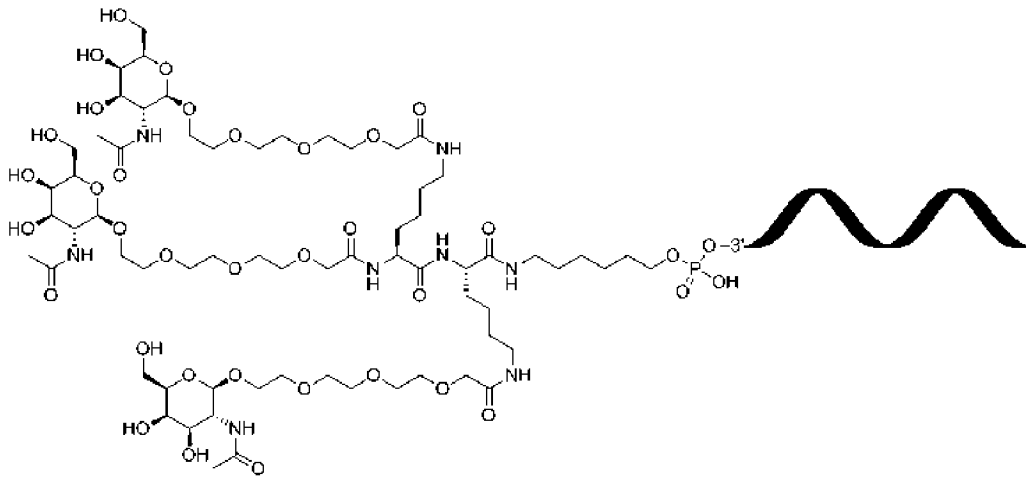
[145] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы II, где каждый n независимо составляет 1-3, k составляет 1-3, m составляет 1 или 2, j составляет 1 или 2, и лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



ФОРМУЛА

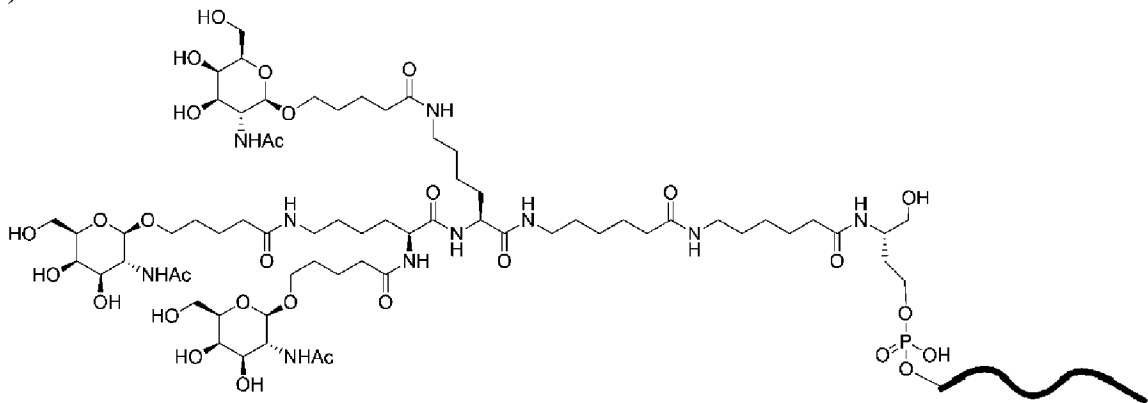
II.

[146] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы III, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



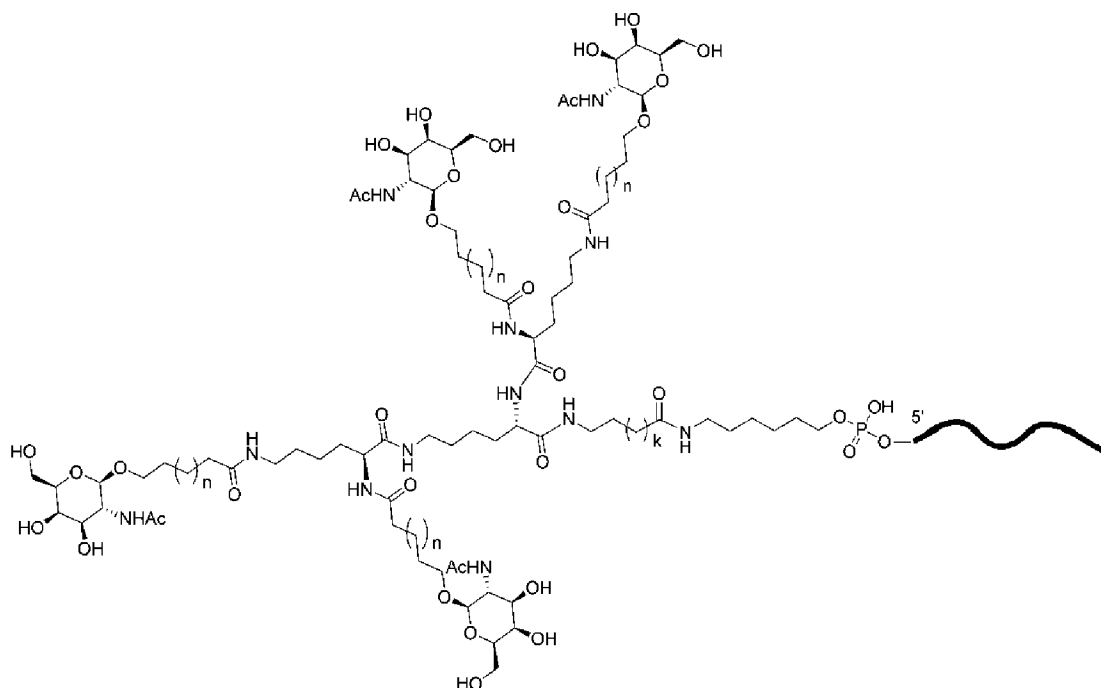
ФОРМУЛА III.

[147] В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы IV, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



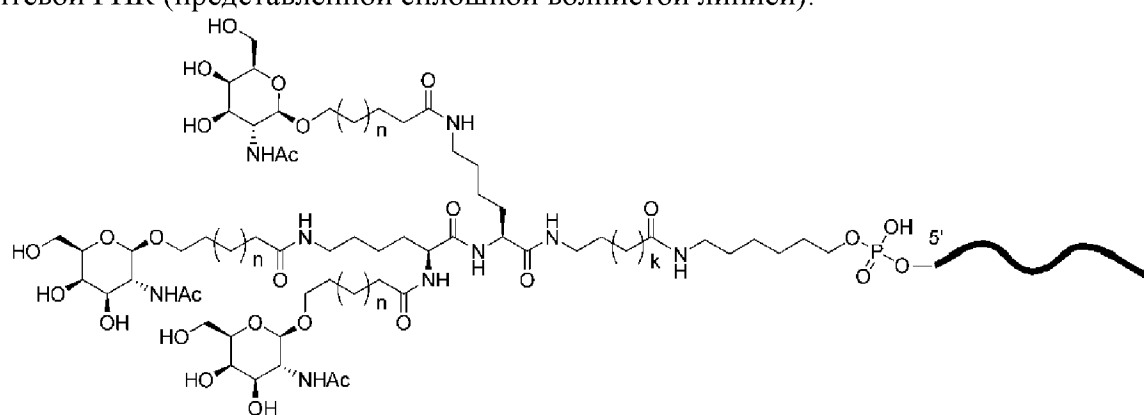
ФОРМУЛА IV.

[148] В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы V, где каждый n независимо составляет 1-3, k составляет 1-3, и лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



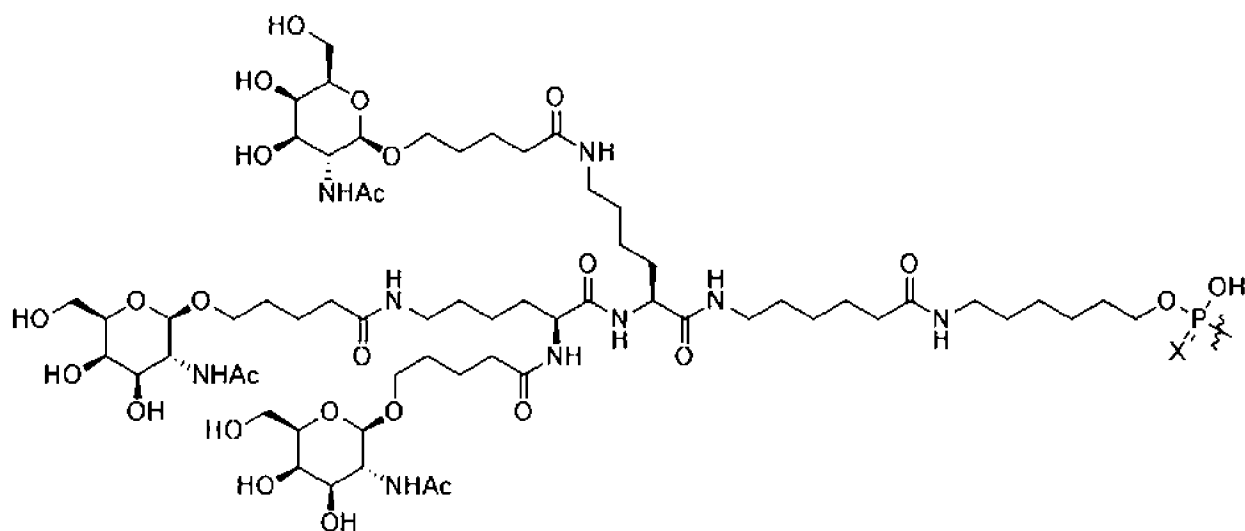
ФОРМУЛА V.

[149] В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы VI, где каждый n независимо составляет 1-3, k составляет 1-3, и лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



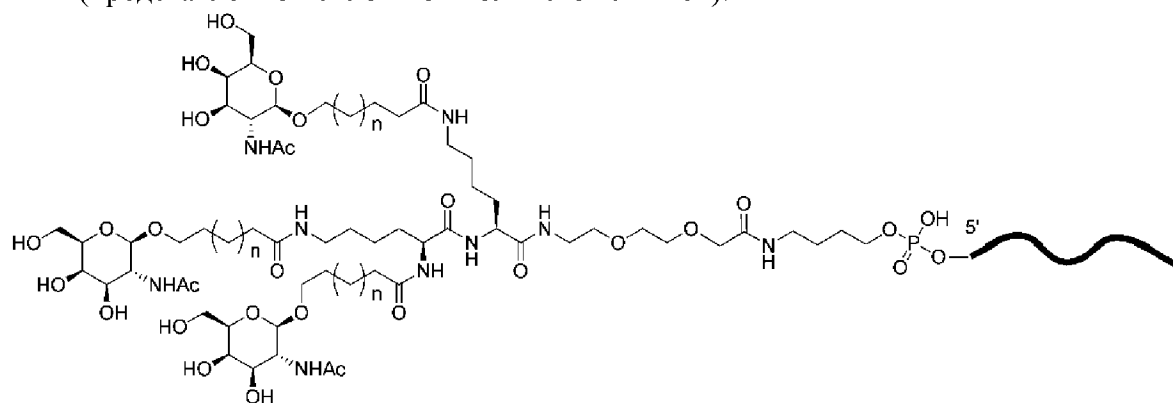
ФОРМУЛА VI.

[150] В одном конкретном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы VII, где X=O или S, и где лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



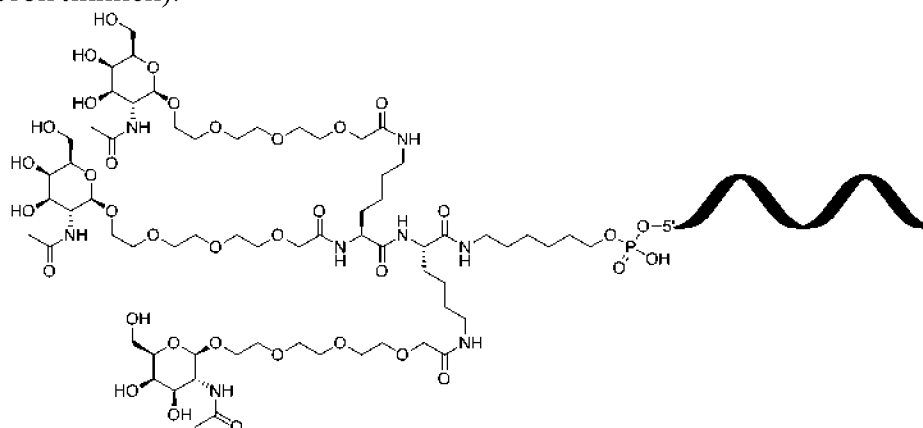
ФОРМУЛА VII.

[151] В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы VIII, где каждый n независимо составляет 1-3, и лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



ФОРМУЛА VIII.

[152] В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит лиганд и линкер, имеющие следующую структуру формулы IX, где лиганд присоединен к 5'-концу смысловой нити молекулы двухнитевой РНК (представленной сплошной волнистой линией):



ФОРМУЛА IX.

[153] Фосфоротиоатная связь может замещать фосфодиэфирную связь, показанную в любой из формул I-IX, для ковалентного присоединения лиганда и линкера к нити нуклеиновой кислоты.

[154] В настоящее изобретение также включены фармацевтические композиции и составы, содержащие описанные в данном документе конструкции для RNAi и фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или разбавители. Такие композиции и составы применимы для снижения экспрессии целевого гена у субъекта, нуждающегося в этом. Если предполагается клиническое применение, фармацевтические композиции и составы будут получать в форме, подходящей для предполагаемого применения. В целом это будет включать получение композиций, которые фактически не содержат пирогены, а также другие примеси, которые могли бы быть вредными для людей или животных.

[155] Фразы “фармацевтически приемлемый” или “фармакологически приемлемый” относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Используемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель” включает растворители, буферы, растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т. п., приемлемые для использования при составлении фармацевтических препаратов, таких как фармацевтические препараты, подходящие для введения людям. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с конструкциями для RNAi по настоящему изобретению, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции при условии, что они не инактивируют конструкции для RNAi в композициях.

[156] Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от целого ряда критериев, включающих без ограничения путь введения, тип и степень заболевания или нарушения, подлежащих лечению, или дозу, подлежащую введению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены на основе предполагаемого пути доставки. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для парентеральной доставки. Парентеральные формы доставки включают внутривенную, внутриартериальную, подкожную, интратекальную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может включать средство для доставки на основе липидов. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может включать

нацеливающий лиганд (например, GalNAc-содержащие или антителосодержащие лиганды, описанные в данном документе).

[157] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество конструкции для RNAi? описанной в данном документе. “Эффективное количество” означает количество, достаточное для получения полезного или требуемого клинического результата. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения экспрессии целевого гена в конкретной ткани или типе клеток (например, в печени или гепатоцитах) субъекта.

[158] Введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно осуществлять любым традиционным путем, если целевая ткань доступна при данном пути. Такие пути введения включают без ограничения парентеральный (например, подкожный, внутримышечный, внутривенный или внутривенный), пероральный, назальный, буккальный, внутрикожный, трансдермальный и сублингвальный пути или за счет прямой инъекции в ткань печени или доставки через воротную вену печени. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально. К примеру, в определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно.

[159] Коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа “масло в воде”, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы, могут использоваться в качестве средств доставки конструкций для RNAi по настоящему изобретению. Коммерчески доступны жировые эмульсии, которые подходят для доставки нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, включают Intralipid® (Baxter International Inc.), Liposyn® (Abbott Pharmaceuticals), Liposyn®II (Hospira), Liposyn®III (Hospira), Nutrilipid (B. Braun Medical Inc.) и другие аналогичные липидные эмульсии. Предпочтительной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vivo* является липосома (т. е. искусственная мембранная везикула). Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы внутри липосом или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)). Получение и применение таких коллоидных дисперсионных систем хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные составы также раскрыты в патенте США №

5981505; патенте США № 6217900; патенте США № 6383512; патенте США № 5783565; патенте США № 7202227; патенте США № 6379965; патенте США № 6127170; патенте США № 5837533; патенте США № 6747014 и WO03/093449.

[160] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению полностью инкапсулированы в липидный состав, например, с образованием SNALP или других частиц типа “нуклеиновая кислота-липид”. Используемый в данном документе термин “SNALP” относится к стабильной частице типа “нуклеиновая кислота-липид”. Как правило, SNALP содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). SNALP исключительно применимы для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной инъекции и накапливаются в периферических сайтах (например, сайтах, физически отделенных от сайта введения). Средний диаметр частиц типа “нуклеиновая кислота-липид”, как правило, составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм или от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и они практически не токсичны. Кроме того, когда нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах типа “нуклеиновая кислота-липид”, они устойчивы к деградации под действием нуклеазы в водном растворе. Частицы типа “нуклеиновая кислота-липид” и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432 и публикации согласно РСТ № WO 96/40964.

[161] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают, например, стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Обычно данные препараты являются стерильными и жидкими до такой степени, что они способны легко проходить через иглу при введении. Препараты должны быть стабильными при условиях изготовления и хранения и должны предохраняться от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Подходящие растворители или дисперсионные среды могут содержать, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может достигаться за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тиомерсала и т. п. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может достигаться за счет использования в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[162] Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения активных соединений в соответствующем количестве в растворитель при необходимости вместе с любыми другими ингредиентами (например, перечисленными выше) с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты, например перечисленные выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения включают методики вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые приводят к получению порошка из активного(-ых) ингредиента(-ов) вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[163] Обычно композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, соли присоединения кислот (образованные со свободными аминогруппами), полученные из неорганических кислот (например, соляной или фосфорной кислот) или полученные из органических кислот (например, уксусной, щавелевой, винной, миндальной и т. п.). Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или железа) или из органических оснований (например, изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т. п.).

[164] Например, для парентерального введения в водном растворе, к примеру, раствор обычно является в достаточной степени забуференным, а жидкому разбавителю сначала придают изотоничность, например, с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие водные растворы можно использовать, например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Предпочтительно используют стерильные водные среды, известные специалистам в данной области, в частности в связи с настоящим изобретением. В качестве иллюстрации одну дозу можно растворять в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлять к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо вводить в предлагаемый сайт инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требуют стандарты FDA. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из стерильного физиологического раствора и конструкции для RNAi, описанной в данном документе. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из конструкции для RNAi, описанной в данном документе, и стерильной воды (например, воды для инъекции, WFI). В еще одних вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит или состоит из конструкции для RNAi, описанной в данном документе, и фосфатно-солевого буфера (PBS).

[165] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению упакованы или хранятся внутри устройства для введения. Устройства для введения инъекционных составов включают без ограничения порт-системы для инъекций, предварительно заполненные шприцы, автоматические инъекторы, инъекционные помпы, нательные инъекторы и шприцы-ручки. Устройства для введения аэрозольных или порошковых составов включают без ограничения ингаляторы, инсуффляторы, аспираторы и т. п. Таким образом, в настоящее изобретение включены устройства для введения, содержащие фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для лечения или предупреждения одного или нескольких заболеваний или нарушений.

[166] В настоящем изобретении предусмотрен способ снижения или подавления экспрессии целевого гена в клетке путем приведения клетки в контакт с любой из конструкций для RNAi, описанных в данном документе. Клетка может находиться в условиях *in vitro* или *in vivo*. Экспрессию целевого гена можно оценить путем измерения количества или уровня целевой мРНК, целевого белка или другого биомаркера, связанного с экспрессией целевого гена. Снижение экспрессии целевого гена в клетках или у животных, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, можно определить в сравнении с экспрессией целевого гена в клетках или у животных, не обработанных конструкцией для RNAi или обработанных контрольной конструкцией для RNAi. К примеру, в некоторых вариантах осуществления снижение или подавление экспрессии целевого гена оценивают путем: (a) измерения количества или уровня целевой мРНК в клетках, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, (b) измерения количества или уровня целевой мРНК в клетках, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, средством для RNAi, направленным на молекулу РНК, не экспрессируемую в данных клетках, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или обработанных без конструкции, и (c) сравнения уровней целевой мРНК, измеренных в обработанных клетках на стадии (a), с уровнями целевой мРНК, измеренными в контрольных клетках на стадии (b). Уровни целевой мРНК в обработанных клетках и контрольных клетках перед сравнением могут быть нормализованы относительно уровней РНК контрольного гена (например, рибосомальной РНК 18S или гена домашнего хозяйства). Уровни целевой мРНК можно измерять с помощью различных методик, включая нозерн-блоттинг, анализы с защитой от действия нуклеаз, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), ПЦР с обратной транскриптазой (RT) (RT-PCR), RT-PCR в режиме реального времени, количественную ПЦР, цифровую капельную ПЦР и т. п.

[167] В других вариантах осуществления снижения или подавления экспрессии целевого гена оценивают путем: (a) измерения количества или уровня целевого белка в клетках, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, (b) измерения количества или уровня целевого белка в клетках, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, средством для RNAi, направленным на молекулу РНК, не

экспрессируемую в данных клетках, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или обработанных без конструкции, и (с) сравнения уровней целевого белка, измеренных в обработанных клетках на стадии (а), с уровнями целевого белка, измеренными в контрольных клетках на стадии (b). Методики измерения уровней целевого белка известны специалистам в данной области, и они включают вестерн-блоттинг, иммунологические анализы (например, ELISA) и проточную цитометрию.

[168] В настоящем изобретении также предусмотрены способы снижения или подавления экспрессии целевого гена у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту любой из конструкций для RNAi, описанных в данном документе. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению можно использовать для лечения или уменьшения интенсивности состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с aberrантной экспрессией или активностью целевого гена, например, когда сверхэкспрессия продукта гена вызывает патологический фенотип. Иллюстративные целевые гены включают без ограничения *LPA*, *PNPLA3*, *ASGR1*, *F7*, *F12*, *FXI*, *APOCIII*, *APOB*, *APOL1*, *TTR*, *PCSK9*, *SCAP*, *KRAS*, *CD274*, *PDCD1*, *C5*, *ALAS1*, *HAO1*, *LDHA*, *ANGPTL3*, *SERPINA1*, *AGT*, *HAMP*, *LECT2*, *EGFR*, *VEGF*, *KIF11*, *AT3*, *CTNNA1*, *HMGB1*, *HIF1A* и *STAT3*. Целевые гены также могут включать вирусные гены, такие как гены вирусов гепатита В и С, гены вируса иммунодефицита человека, гены вируса герпеса и т. д. В некоторых вариантах осуществления целевой ген представляет собой ген, который кодирует микроРНК человека (miRNA).

[169] В определенных вариантах осуществления экспрессия целевого гена снижается в клетках или у субъекта на по меньшей мере 50% под действием конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессия целевого гена снижается в клетках или у субъекта на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85% под действием конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления экспрессия целевого гена снижается в клетках печени на приблизительно 90% или больше, например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше, под действием конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Процент снижения экспрессии целевого гена можно измерять с помощью любых способов, описанных в данном документе, а также других способов, известных из уровня техники.

[170] Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, предоставлены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Активность конструкций для RNAi PNPLA3 с различными паттернами химических модификаций *in vivo*

[171] Чтобы оценить влияние различных паттернов химических модификаций на эффективность конструкций для RNAi *in vivo*, конструкции для RNAi, нацеливающиеся на

ген белка 3, содержащего пататин-подобный фосфолипазный домен (PNPLA3), синтезировали с различными паттернами из 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов и 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и оценивали на гуманизированной мышинной модели, экспрессирующей PNPLA3, как подробно описано ниже.

[172] Конструкции для RNAi синтезировали с использованием твердофазной фосфорамидитной химии. Синтез проводили на приборе MerMade12 (Bioautomation).

Материалы

[173] Ацетонитрил (степень чистоты для синтеза ДНК, AXO152-2505, EMD)

[174] Блокирующий реагент А (80:10:10 (об./об./об.) тетрагидрофуран/лутидин/уксусный ангидрид, BIO221/4000, EMD)

[175] Блокирующий реагент В (16% 1-метилимидазол/тетрагидрофуран, BIO345/4000, EMD)

[176] Активирующий раствор (0,25 М 5-(этилтио)-1Н-тетразол (ЕТТ) в ацетонитриле, BIO152/0960, EMD)

[177] Реагент для детритилирования (3% дихлоруксусная кислота в дихлорметане, BIO830/4000, EMD)

[178] Окислительный реагент (0,02 М йода в 70:20:10 (об./об./об.) тетрагидрофурана/пиридина/воды, BIO420/4000, EMD)

[179] Раствор диэтиламина (20% DEA в ацетонитриле, NC0017-0505, EMD)

[180] Реагент для тиолирования (0,05 М 5-N-[(диметиламино)метил]амино-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион (BIOSULII/160K) в 40:60 (об./об.) пиридина/ацетонитрила)

[181] 5'-Аминогексильный линкер-фосфорамидит, фосфорилирующий фосфорамидит, 2'-дезокситимидин-фосфорамидит и 2'-метокси- и 2'-фтор-фосфорамидиты аденозина, гуанозина, цитозина и уридина (Thermo Fisher Scientific), 0,10 М в ацетонитриле на ~10 мл молекулярных сит (3 Å, J. T. Baker)

[182] Подложка CPG (Hi-Load Universal Support, 500A (BH5-3500-G1), 79,6 мкмоль/г, 0,126 г (10 мкмоль))

[183] Гидроксид аммония (концентрированный, J. T. Baker)

Синтез

[184] Растворы реагентов, растворы фосфорамидитов и растворители прилагались к прибору MerMade12. В каждую колонку добавляли твердую подложку (пробирка для SPE объемом 4 мл с верхней и нижней фриттой) и колонки прикрепляли к прибору. Колонки дважды промывали ацетонитрилом. Линии для растворов фосфорамидитов и реагентов продували. Синтез инициировали с использованием программного обеспечения Poseidon. Синтез осуществляли путем повторения цикла синтеза, состоящего из снятия защиты/сочетания/окисления/блокирования. В частности, к твердой подложке добавляли реагент для детритилирования для удаления 5'-диметокситритильной (DMT) защитной группы. Твердую подложку промывали ацетонитрилом. К подложке добавляли фосфорамидит и активирующий раствор с последующей инкубацией для сочетания поступающего нуклеотида со свободной 5'-гидроксильной группой. Подложку промывали

ацетонитрилом. К подложке добавляли окислительный реагент или реагент для тиолирования для превращения сложного фосфитного триэфира в сложный фосфатный триэфир или фосфоротиоат. К подложке добавляли блокирующие реагенты А и В для прекращения синтеза всех непрореагировавших олигонуклеотидных нитей. Подложку промывали ацетонитрилом. После последнего цикла реакции смолу промывали раствором диэтиламина для удаления 2-цианоэтильных защитных групп. Подложку промывали ацетонитрилом и сушили под вакуумом.

Конъюгация GalNAc

[185] Для конъюгации с трехвалентным N-ацетилгалактозаминовым (GalNAc) фрагментом (структура показана в формуле VII ниже) получали смысловые нити с 5'-аминогексильным линкером. После автоматического синтеза колонку снимали с прибора и переносили в вакуумный коллектор в вытяжном шкафу. 5'-Монометокситритильную (ММТ) защитную группу удаляли с твердой подложки путем последовательных обработок с помощью аликвот 1% трифторуксусной кислоты (TFA) в дихлорметане (DCM) объемом 2 мл с помощью вакуумной фильтрации. Когда в элюенте больше не наблюдался оранжево-желтый цвет, смолу промывали дихлорметаном. Смолу промывали с помощью 5 мл 2% диизопропилэтиламина в N, N-диметилформамиде (DMF). В отдельном флаконе готовили раствор GalNAc3-Lys2-Ahx (67 мг, 40 мкмоль) в DMF (0,5 мл), структура и синтез которого описаны ниже, с 1,1,3,3-тетраметилуруния тетрафторборатом (TATU, 12,83 мг, 40 мкмоль) и диизопропилэтиламином (DIEA) (10,5 мкл, 360 мкмоль). Активированный раствор для сочетания добавляли к смоле и колонку закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Смолу промывали DMF, DCM и сушили под вакуумом.

Отщепление

[186] Колонки для синтеза извлекали из синтезатора или вакуумного коллектора. Твердую подложку из каждой колонки переносили во флакон объемом 10 мл. К твердой подложке добавляли 4 мл концентрированного гидроксида аммония. К бутылки плотно прикрепляли колпачок и смесь нагревали при 55°C в течение 4 ч. Бутыль перемещали в морозильную камеру и охлаждали в течение 20 минут перед открытием в вытяжном шкафу. Смесь фильтровали через пробирку для SPE объемом 8 мл для удаления твердого подложки. Сосуд и твердую подложку промывали с помощью 1 мл смеси этанол/вода 50:50.

Анализ и очистка

[187] Часть объединенного фильтрата анализировали и очищали с помощью анионообменной хроматографии. Объединенные фракции обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и анализировали с применением ион-парной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (HPLC-MS). Объединенные фракции лиофилизировали с получением белого аморфного порошка.

Аналитическая анионообменная хроматография (АЕХ):

[188] Колонка: Thermo DNAPac PA200RS (4,6×50 мм, 4 мкм)

[189] Прибор: Agilent 1100 HPLC

[190] Буфер А: 20 mM фосфата натрия, 10% ацетонитрила, pH 8,5

[191] Буфер В: 20 мМ фосфата натрия, 10% ацетонитрила, рН 8,5, 1 М бромида натрия

[192] Скорость потока: 1 мл/мин при 40°C

[193] Градиент: 20-65% В за 6,2 мин

Препаративная анионообменная хроматография (АЕХ):

[194] Колонка: Tosoh TSK Gel SuperQ-5PW, 21×150 мм, 13 мкм

[195] Прибор: Agilent 1200 HPLC

[196] Буфер А: 20 мМ фосфата натрия, 10% ацетонитрила, рН 8,5

[197] Буфер В: 20 мМ фосфата натрия, 10% ацетонитрила, рН 8,5, 1 М бромида натрия

[198] Скорость потока: 8 мл/мин

[199] Вводимый объем: 5 мл

[200] Градиент: 35-55% В за 20 мин

Препаративная эксклюзионная хроматография (SEC):

[201] Колонка: GE Hi-Prep 26/10

[202] Прибор: GE АКТА Pure

[203] Буфер: 20% этанола в воде

[204] Скорость потока: 10 мл/мин

[205] Вводимый объем: 15 мл с использованием насоса для загрузки пробы

Ион-парная обращенно-фазовая (IP-RP) HPLC:

[206] Колонка: Water Xbridge ВЕН OST C18, 2,5 мкм, 2,1×50 мм

[207] Прибор: Agilent 1100 HPLC

[208] Буфер А: 15,7 мМ DIEA, 50 мМ гексафторизопропанола (HFIP) в воде

[209] Буфер В: 15,7 мМ DIEA, 50 мМ HFIP в смеси вода/ацетонитрил 50:50

[210] Скорость потока: 0,5 мл/мин

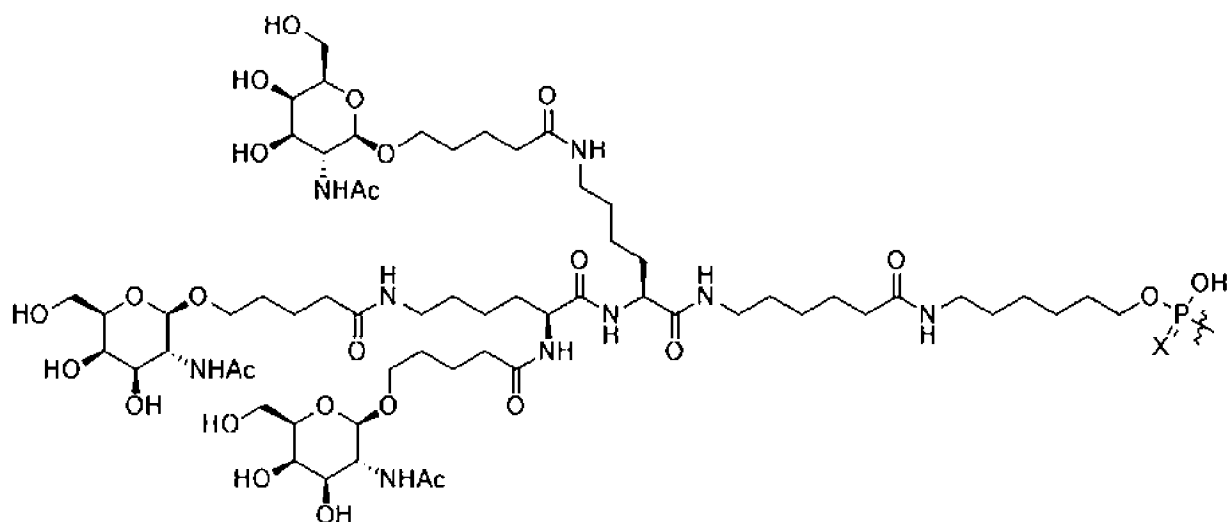
[211] Градиент: 10-30% В за 6 мин

Гибридизация

[212] Небольшое количество смысловой нити и антисмысловой нити взвешивали в отдельные флаконы. Во флаконы добавляли буфер для восстановления siRNA (Qiagen) или фосфатно-солевой буфер (PBS) до концентрации, составляющей приблизительно 2 мМ в расчете на сухую массу. Фактическую концентрацию образца измеряли на NanoDrop One (ssDNA, коэффициент экстинкции=33 мкг/OD260). Затем две нити смешивали при эквимольном соотношении и образец нагревали в течение 5 минут в инкубаторе при 90°C и давали ему медленно остыть до комнатной температуры. Образец анализировали с помощью АЕХ. Дуплекс регистрировали и отправляли на тестирование *in vivo*, как более подробно описано ниже.

Получение GalNAc3-Lys2-Ahx

Формула VII



где X=O или S. Волнистая линия представляет точку присоединения к 5'-терминальному нуклеотиду смысловой нити конструкции для RNAi.

[213] В пробирку Falcon объемом 50 мл добавляли Fmoc-Ahx-OH (1,13 г, 3,19 ммоль) в DCM (30 мл), а затем DIEA (2,23 мл, 12,78 ммоль). Раствор добавляли к 2-Cl тритилхлоридной смоле (3,03 г, 4,79 ммоль) в центрифужной пробирке объемом 50 мл и загружали на встряхивающее устройство на 2 ч. Растворитель сливали и смолу промывали смесью DCM/MeOH/DIEA 17:2:1 (30 мл x 2), DCM (30 мл x 4) и высушивали. С помощью УФ-спектрофотометрического обнаружения при 290 нм определяли, что загрузка составляет 0,76 ммоль/г.

[214] 3 г загруженной 2-Cl тритиловой смолы суспендировали в 20% растворе 4-метилпиперидина в DMF (20 мл) и через 30 мин растворитель сливали. Процесс повторяли еще раз, и смолу промывали с помощью DMF (30 мл x 3) и DCM (30 мл x 3).

[215] К раствору Fmoc-Lys(ivDde)-OH (3,45 г, 6 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли TATU (1,94 г, 6 ммоль), а затем DIEA (1,83 мл, 10,5 ммоль). Затем раствор добавляли к вышеописанной смоле со снятой защитной группой и суспензию оставляли на встряхивателе на ночь. Растворитель сливали и смолу промывали с помощью DMF (30 мл x 3) и DCM (30 мл x 3).

[216] Смолу обрабатывали 20% раствором 4-метилпиперидина в DMF (15 мл) и растворитель сливали через 10 мин. Процесс повторяли еще раз, и смолу промывали с помощью DMF (15 мл x 4) и DCM (15 мл x 4).

[217] К раствору Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (3,54 г, 6 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли TATU (1,94 г, 6 ммоль), а затем DIEA (1,83 мл, 10,5 ммоль). Затем раствор добавляли вышеописанной к смоле со снятой защитной группой и суспензию оставляли на встряхивателе на ночь. Растворитель сливали и смолу промывали с помощью DMF (30 мл x 3) и DCM (30 мл x 3).

[218] Смолу обрабатывали 5% раствором гидразина в DMF (20 мл) и растворитель сливали через 5 мин. Процесс повторяли еще четыре раза и смолу промывали с помощью DMF (30 мл x 4) и DCM (30 мл x 4).

[219] К раствору 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-ацетамидо-4,5-диацетокси-6-

(ацетоксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)пентановой кислоты (4,47 г, 10 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли TATU (3,22 г, 10 ммоль) и раствор перемешивали в течение 5 мин. К раствору добавляли DIEA (2,96 мл, 17 ммоль), а затем смесь добавляли к вышеописанной смоле. Суспензию выдерживали при комнатной температуре на протяжении ночи и растворитель сливали. Смолу промывали с помощью DMF (3×30 мл) и DCM (3×30 мл).

[220] Смолу обрабатывали 1% раствором TFA в DCM (30 мл с 3% триизопропилсилана) и растворитель сливали через 5 мин. Процесс повторяли еще три раза, и объединенный фильтрат концентрировали *in vacuo*. Остаток растирали с диэтиловым эфиром (50 мл) и суспензию фильтровали и сушили с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии и элюировали с помощью 0-20% MeCN в воде. Фракции объединяли и лиофилизировали с получением продукта в виде белого твердого вещества.

[221] В таблице 1 ниже показаны положения модификаций в смысловой и антисмысловой последовательностях для каждой из модифицированных конструкций для RNAi PNPLA3. Нуклеотидные последовательности перечислены в соответствии со следующими обозначениями: dT, dA, dG, dC=соответствующий дезоксирибонуклеотид; a, u, g и c=соответствующий 2'-О-метилрибонуклеотид; Af, Uf, Gf и Cf=соответствующий 2'-дезокси-2'-фтор (“2'-фтор”)-рибонуклеотид; Phos=терминальный нуклеотид с монофосфатной группой на 5'-конце; invAb=инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием (т. е. нуклеотид с удаленным азотистым основанием, связанный с соседним нуклеотидом через заместитель в его 3'-положении (связь 3'-3'), если он находится на 3'-конце нити, или связанный с соседним нуклеотидом через заместитель в его 5'-положении (межнуклеотидная связь 5'-5'), если он находится на 5'-конце нити) и invdX=инвертированный дезоксирибонуклеотид (т. е. дезоксирибонуклеотид, связанный с соседним нуклеотидом через заместитель в его 3'-положении (связь 3'-3'), если он находится на 3'-конце нити, или связанный с соседним нуклеотидом через заместитель в его 5'-положении (межнуклеотидная связь 5'-5'), если он находится на 5'-конце нити). Вставка “s” в последовательность означает, что два соседних нуклеотида связаны фосфоротиодизфирной группой (например, фосфоротиодатной межнуклеотидной связью). Если не указано иное, все остальные нуклеотиды связаны 3'-5'-фосфодиэфирными группами. Все конструкции для RNAi конъюгировали с GalNAc-фрагментом, показанным в формуле VII, через 5'-конец смысловой нити. В таблице 1 также перечислено обозначение паттернов и обозначение семейств последовательностей для каждой конструкции для RNAi. Обозначения паттернов схематически представлены на фиг. 1. Если конструкция для RNAi имеет то же обозначение семейства последовательностей, что и другая конструкция для RNAi, то эти две конструкции имеют одинаковую коровую последовательность, но отличаются паттерном химических модификаций.

Таблица 1. Иллюстративные модифицированные конструкции для RNAi PNPLA3

№ дуплекса	Обозначение паттерна	Обозначение семейства	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
2118	CM1	T2	CfgGfcCfaAfuGfUfCfcAfc CfaGfcUfsusUf	1	{Phos}asGfscUfgGfuGfgacAfu UfgGfcCfgsUfsu	40
4544	P1	T2	cggccaAfuGfUfCfCfaccagc ususu	2	{Phos}asGfscUfgGfUfggacAfu Ufggccgsusu	41
2119	CM1	T3	GfgUfcCfaGfcCfUfGfaAfc UfuCfuUfsusUf	3	{Phos}asAfsGfAfaGfuUfcagGfc UfgGfaCfcsUfsu	42
3552	P1	T3	gguccaGfcCfUfGfAfacuucu ususu	4	{Phos}asAfsGfAfaGfUfucagGfc Ufggaccsusu	43
2125	CM1	T5	GfcUfuCfaUfgCfCfCfuUfc UfaCfaGfsusUf	5	{Phos}csUfsgUfaGfaAfgggCfa UfgAfaGfcsUfsu	44
2393	P1	T5	gcuucaUfgCfCfCfUfucuaca gsusu	6	{Phos}csUfsgUfaGfAfaaggCfa Ufgaagcsusu	45
2120	CM1	T6	GfcGfgCfuUfcCfUfGfgGfc UfuCfuAfsusUf	7	{Phos}usAfsGfAfaGfcCfcagGfa AfgCfcGfcsUfsu	46
3464	P1	T6	gcggcuUfcCfUfGfGfgcuuc uasusu	8	{Phos}usAfsGfAfaGfCfccagGfa Afgccgsusu	47
2121	CM1	T8	GfuGfaCfaAfcGfUfAfcCfc UfuCfaUfsusUf	9	{Phos}asUfsgAfaGfgGfuacGfu UfgUfcAfcUfsu	48
3918	P1	T8	gugacaAfcGfUfAfcfccuuca ususu	10	{Phos}asUfsgAfaGfGfguacGfu Ufguacsusu	49
2124	CM1	T11	GfgUfaUfgUfuCfCfUfgCfu UfcAfuGfsusUf	11	{Phos}csAfsuGfaAfgCfaggAfa CfaUfaCfcsUfsu	50
2390	P1	T11	ggsuaugUfuCfCfUfgfcuuca ugsusu	12	{Phos}csAfsuGfaAfGfcaggAfa Cfauaccsusu	51
2370	CM1	T12	GfuAfuGfuUfcCfUfGfcUfu CfaUfgCfsusUf	13	{Phos}gsCfsaUfgAfaGfcagGfa AfcAfuAfcUfsu	52
2391	P1	T12	guauguUfcCfUfGfCfucau gcsusu	14	{Phos}gsCfsaUfgAfAfgcagGfa Afcuacsusu	53

2371	CM1	T15	UfgUfuCfcUfgCfUfUfcAfu GfcCfcUfsusUf	15	{Phos}asGfsgGfcAfuGfaagCfa GfgAfaCfasUfsu	54
2392	P1	T15	uguuccUfgCfUfUfCfaugccc ususu	16	{Phos}asGfsgGfcAfUfgaagCfa Gfgaacasusu	55
2122	CM1	T16	GfuUfcCfuGfcUfUfCfaUfg CfcCfuUfsusUf	17	{Phos}asAfsGfgCfaUfgaaGfc AfgGfaAfcUfsu	56
3465	P1	T16	guuccuGfcUfUfCfAfugcccu ususu	18	{Phos}asAfsGfgCfAfugaaGfc Afggaacsusu	57
2368	CM1	T19	CfcUfgCfuUfcAfUfGfcCfc UfuCfuAfsusUf	19	{Phos}usAfsGafaGfgGfcuGfa AfgCfaGfgUfsu	58
3467	P1	T19	ccugcuUfcAfUfGfCfcuucu asusu	20	{Phos}usAfsGafaGfGfgcauGfa Afgcaggsusu	59
2369	CM1	T23	CfuUfcAfuGfcCfCfUfuCfu AfcAfgUfsusUf	21	{Phos}asCfsuGfuAfgAfgGfc AfuGfaAfgUfsu	60
2394	P1	T23	cuucauGfcCfCfUfUfcuacag ususu	22	{Phos}asCfsuGfuAfGfaaggGfc Afugaagsusu	61
2123	CM1	T24	UfuCfaUfgCfcCfUfUfcUfa CfaGfuGfsusUf	23	{Phos}csAfsUfgUfaGfaagGfg CfaUfgAfasUfsu	62
3539	P1	T24	uucaugCfcCfUfUfCfuacagu gsusu	24	{Phos}csAfsUfgUfAfgaagGfg Cfaugaasusu	63
3558	CM1	T27	AfuGfcCfcUfuCfUfAfcAfg UfgGfcCfsusUf	25	{Phos}gsGfscCfaCfuGfuagAfa GfgGfcAfusUfsu	64
3916	P1	T27	augcccUfuCfUfAfCfaguggc csusu	26	{Phos}gsGfscCfaCfUfguagAfa Gfggcaususu	65
3540	P1	T5	gcuucaUfgCfCfUfucua ususu	27	{Phos}asUfsgUfaGfAfgggCfa Ufgaagcsusu	66
5241	P2	T5	[invAb]gcuucaUfgCfCfU fucuaususu	28	{Phos}asUfsgUfaGfAfgggCfa Ufgaagcsusu	66
5614	P3	T5	cugcuucaUfgCfCfUfucua cas[invAb]	29	{Phos}asUfsgUfaGfAfgggCfa Ufgaagcagsusu	67
5615	P4	T5	[invAb]cugcuucaUfgCfCfC fUfucuaacsasu	30	{Phos}asUfsgUfaGfAfgggCfa Ufgaagcagsusu	67
6191	P3	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	{Phos}asUfsgUfaGfAfaaggCfa Ufgaagcagsusu	68

6267	P9	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	{Phos}asUfsguagAfaaggCfaUfg aagcagsusu	69
7320	P9	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invdA]	32	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	70
7318	P9	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	71
7062	P9	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuac ags[invAb]	33	asCfsuguaGfaaagGfcAfugaagca susu	72
8513	P9	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuac ags[invdA]	34	usCfsuguaGfaaagGfcAfugaagca susu	73
8709	P9	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invdT]	35	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	71
8103	CM2	T5,1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucua casu	36	asUfsguaGfaaAfggcaUfgAfagca gsusu	74
8104	CM3	T5,1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucua casu	36	asUfsguaGfaaaggcaUfgAfagcag susu	75
8105	CM4	T5,1	cugcuuCfaUfGfCfcuuucua casu	36	asUfsguaGfaAfAfggcaUfgAfag cagsusu	76
7463	P11	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	asUfsgUfagAfaaggCfaUfgaagca gsusu	77
7464	P10	T5,1	[invAb]cugcuucaUfgCfCfU fUfucuaacsasu	37	asUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	71
7466	P16	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagca	78

					gsusu	
7469	P17	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucU faCfas[invAb]	38	asUfsguagAfaaGfgCfaUfgaagca gsusu	78
7470	P15	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	79
6883	P3	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	80
7319	P9	T5,1	cugcuucaUfgCfCfUfUfucua cas[invAb]	31	usUfsguagAfaaggCfaUfgaagcag susu	70
7064	P3	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuac ags[invAb]	33	asCfsuGfuAfGfaaagGfcAfugaa gcasusu	71
7576	P11	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuac ags[invAb]	33	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	72
7579	P18	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuac ags[invAb]	33	asCfsuGfuaGfaaAfgGfcAfugaa gcasusu	73
7580	P12	T23	ugcuucauGfcCfUfUfUfcuA fcAfgs[invAb]	39	asCfsuGfuaGfaaagGfcAfugaagc asusu	72

[222] В первоначальной серии экспериментов синтезировали тринадцать различных конструкций для RNAi PNPLA3 с разными последовательностями с получением паттерна химических модификаций P1 или контрольного паттерна химических модификаций CM1. Сообщалось, что молекулы siRNA с контрольным паттерном химических модификаций CM1 характеризуются эффективными и продолжительными эффектами в отношении сайленсинга генов *in vivo*. См. Nair *et al.*, J. Am. Chem. Soc., Vol. 136:16958-16961, 2014. Эффективность химически модифицированных конструкций для RNAi в отношении подавления экспрессии гена PNPLA3 оценивали на гуманизированной мышинной модели, экспрессирующей PNPLA3 человека дикого типа или варианты формы PNPLA3 человека. Для создания мышинной модели аденоассоциированный вирус (AAV; серотип AAV8 или AAV7; без эндотоксинов), разведенный в фосфатно-солевом буфере (Thermo

Fisher Scientific, 14190-136) до 1×10^{12} вирусных частиц на животное, вводили внутривенной инъекцией в хвостовую вену самцов мышей C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories Inc.) для запуска экспрессии генов *PNPLA3*, *PNPLA3^{rs738409}* или *PNPLA3^{rs738409-rs738408}* человека. Возраст мышей в целом составлял 10-12 недель и в каждую группу обработки включали по n=4-6 животных.

[223] Все конструкции для RNAi тестировали на мышах, которым вводили инъекцией AAV-*PNPLA3*, *PNPLA3^{rs738409}* и/или *PNPLA3^{rs738409-rs738408}*. Также включали по меньшей мере две контрольные группы, обработанные средой-носителем: группу с пустым вектором AAV и AAV-*PNPLA3*, *PNPLA3^{rs738409}* или *PNPLA3^{rs738409-rs738408}*, обработанные средой-носителем. Через две недели после инъекции AAV мышей обрабатывали с помощью однократной дозы конструкции для RNAi (0,5 мМ), вводимой посредством подкожной инъекции в дозе 0,5, 1,0, 3,0 или 5,0 миллиграммов на килограмм животного, разведенной в фосфатно-солевом буфере (Thermo Fisher Scientific, 14190-136). В дни 8, 15, 22, 28 или 42 после инъекции конструкции для RNAi у животных собирали ткани печени, быстро замораживали их в жидком азоте, обрабатывали для выделения очищенной РНК с использованием прибора Qiagen QIAcube HT (9001793) и набора Qiagen RNeasy 96 QIAcube HT (74171) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали с использованием системы QIAxpert (9002340). РНК обрабатывали ДНКазой, не содержащей РНКаз, Promega RQ1 (M6101) и подготавливали для qPCR в режиме реального времени с использованием набора для 1-стадийной реакции Applied Biosystem TaqMan™ RNA-to-CT™ (4392653). qPCR в режиме реального времени проводили на приборе для ППЦ в режиме реального времени QuantStudio. Результаты основаны на экспрессии *PNPLA3* человека, нормализованной по *Gapdh* мыши (анализы TaqMan™ от Invitrogen, hs00228747_m1 и 4352932E соответственно), и представлены как относительный нокдаун экспрессии мРНК *PNPLA3* человека в сравнении и контрольными животными, обработанными средой-носителем.

[224] Результаты, полученные в этой первоначальной серии экспериментов, сравнивающих конструкции для RNAi с паттерном химических модификаций P1 (дуплексы №№ 4544, 3552, 2393, 3464, 3918, 2390, 2391, 2392, 3465, 3467, 2394, 3539 и 3916) с конструкциями с контрольным паттерном модификаций SM1 (дуплексы №№ 2118, 2119, 2125, 2120, 2121, 2124, 2370, 2371, 2122, 2368, 2369, 2123 и 3558), показаны на фиг. 2. Когда конструкции для RNAi вводили подкожно в дозе 5 мг/кг мышам, экспрессирующим вариант гена *PNPLA3^{rs738409}* человека, при измерении через 8 дней после инъекции конструкции с паттерном комбинацию P1 в целом снижали экспрессию *PNPLA3* в большей степени, чем конструкции с паттерном SM1 независимо от последовательности.

[225] Варианты паттерна модификаций P1, направленные на модификацию длины нитей, природы концов конструкции для RNAi (т. е. липкий конец против тупого конца) и/или на включение инвертированных нуклеотидов с удаленным азотистым основанием на 5'- или 3'-конце смысловой нити, выполняли и применяли к конструкциям для RNAi, имеющим одинаковую коровую последовательность. Конструкции для RNAi с новыми

паттернами оценивали на гуманизированной мышинной модели в отношении улучшений эффективности *in vivo*. В частности, конструкции для RNAi с паттернами химических модификаций P1, P2, P3 или P4 (дуплексы №№ 3540, 5241, 5614 и 5615) вводили подкожно мышам, экспрессирующим вариант гена *PNPLA3^{rs738409}* человека, в дозе 5 мг/кг. Уровни экспрессии PNPLA3 человека в печени оценивали через 15 дней после введения конструкций для RNAi. Результаты показаны на фиг. 3. Конструкции для RNAi с паттернами P2, P3 или P4 приводили к большему среднему снижению экспрессии PNPLA3, чем конструкции для RNAi с паттерном P1.

[226] Для увеличения эффективности и продолжительности нокдауна мРНК *in vivo* получали дополнительные варианты паттерна P3. 2'-Фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 4 и 6 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, в паттерне P3 (дуплекс № 6191) заменяли на 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды с получением паттерна P9 (дуплекс № 6267). Также синтезировали конструкцию для RNAi, имеющую паттерн P9 с инвертированным аденозиновым дезоксирибонуклеотидом вместо инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием на 3'-конце смысловой нити (дуплекс № 7320). Все три конструкции оценивали на гуманизированной мышинной модели, описанной выше. У животных, обработанных дуплексом № 6267 в дозе 5 мг/кг, экспрессия PNPLA3 человека в печени снижалась на 97% через 22 дня после введения, тогда как животные, обработанные дуплексом № 6191 в дозе 5 мг/кг, демонстрировали 92% снижение уровней экспрессии PNPLA3 человека в печени в тот же момент времени. Дуплекс № 7320 был более эффективным и приводил к более длительному нокдауну гена, чем дуплексы №№ 6191 и 6267, поскольку животные, обработанные дуплексом № 7320 в дозе 3 мг/кг, демонстрировали 95% снижение уровней экспрессии PNPLA3 человека в печени через 28 дней после введения.

[227] Паттерн P9 вводили в конструкции для RNAi PNPLA3 с двумя различными коровыми последовательностями (дуплексы №№ 7318, 7320, 7062, 8513 и 8709) и оценивали в отношении эффективности *in vivo* в анализе с биолюминесцентной визуализацией *in vivo* в дозах 1 мг/кг и 3 мг/кг. Для анализа с биолюминесцентной визуализацией разработали вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий промотор гена цитомегаловируса мыши, полную последовательность люциферазы светляка, а затем, непосредственно ниже стоп-кодона люциферазы светляка, синтезированную цепочку последовательностей мРНК, специфичных для тестируемых конструкций для RNAi. Последовательности мРНК фланкировали десятью дополнительными нуклеотидами на каждом конце. Вектор "PP3A (DM)" упаковывали в AAV серотипа AAVDJ8 (без эндотоксинов). Перед инъекцией PP3A (DM) разводили в фосфатно-солевом буфере (Thermo Fisher Scientific, 14190-136) до 5×10^{11} вирусных частиц на животное и вводили внутривенной инъекцией в хвостовую вену самцам мышей BALB/c (Charles River Laboratories Inc.). Возраст мышей в целом составлял 10-12 недель и в группу включали по n=5 животных.

[228] Через две недели после инъекции AAV мышам вводили биолюминесцентный

субстрат D-люциферин RediJect (PerkinElmer, 770504) в соответствии с инструкциями производителя. После десятиминутного облучения мышей визуализировали с помощью системы визуализации In Vivo IVIS Spectrum (PerkinElmer). Затем мышей рандомизировали в группы в соответствии с исходными баллами общего потока из определенной представляющей интерес области, охватывающей печень. После рандомизации мышей обрабатывали однократной дозой конструкции для RNAi (0,5 мМ), вводимой путем подкожной инъекции в дозе 1,0 или 3,0 миллиграмма на килограмм массы тела, разбавленной фосфатно-солевым буфером (Thermo Fisher Scientific, 14190-136), или обрабатывали только фосфатно-солевым буфером (обозначено как “среда-носитель”). Визуализацию мышей проводили еженедельно по одному и тому же протоколу с применением тех же условий гейтирования для баллов общего потока. Данные представлены как общий поток (фотонов в секунду, ось y) в зависимости от недели после инъекции конструкции для RNAi (ось x). Снижение общего потока указывает на снижение экспрессии репортерного гена люциферазы.

[229] Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 4А и 4В. Сигнал репортерного гена люциферазы у животных, обработанных различными конструкциями для RNAi, имеющими паттерн P9, был значительно снижен по сравнению с сигналом от животных, обработанных средой-носителем, в течение по меньшей мере 3 недель после введения однократной дозы 1 мг/кг (фиг. 4А) и по меньшей мере 5 недель в случае однократной дозы 3 мг/кг (фиг. 4В) конструкций для RNAi. Для многих конструкций для RNAi однократной дозы 3 мг/кг было достаточно для подавления экспрессии репортерного гена люциферазы на срок до 6 недель.

[230] Данные конструкции для RNAi (дуплексы №№ 7318, 7320, 7062, 8513 и 8709) также оценивали на гуманизированной мышинной модели, описанной выше. В частности, конструкции для RNAi вводили подкожно мышам, экспрессирующим гуманизированный вариант гена *PNPLA3^{rs738409-rs738408}*, в дозе 0,5, 1 или 3 мг/кг. Уровни экспрессии PNPLA3 человека в печени оценивали с помощью qPCR через 28 или 42 дня после введения конструкций для RNAi. Результаты представлены как относительный нокдаун экспрессии мРНК *PNPLA3* человека в сравнении с контрольными животными, обработанным средой-носителем, и они показаны в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Эффективность конструкций для RNAi PNPLA3 in vivo

№ дуплекса	Доза (мг/кг)	День 28		День 42	
		Среднее значение относительно нокдауна (n=4)	Стандартная ошибка	Среднее значение относительно нокдауна (n=4)	Стандартная ошибка
8709	0,5	-57,95	2,07	-	-
8513	0,5	-46,58	7,95	-	-

7318	0,5	-68,83	6,18	-	-
7320	0,5	-50,01	3,38	-	-
7062	0,5	-50,65	5,23	-	-
8709	1	-71,96	4,58	-54,55	5,67
8513	1	-74,47	2,17	-60,54	2,32
7318	1	-76,88	3,04	-71,07	2,41
7320	1	-66,30	3,27	-62,21	4,36
7062	1	-69,37	2,32	-57,74	4,30
8709	3	-91,70	2,00	-81,13	3,19
8513	3	-90,54	1,17	-74,77	3,28
7318	3	-93,25	1,13	-70,80	8,38
7320	3	-91,08	0,60	-80,12	4,64
7062	3	-90,52	1,42	-83,75	1,56

[231] Конструкции для RNAi, имеющие паттерн модификаций P9, являются более эффективными и приводят к более длительному нокдауну гена, чем ранее протестированные паттерны. Введение конструкций для RNAi в однократной дозе 0,5 мг/кг приводило к приблизительно 50% снижению экспрессии PNPLA3 человека в печени через четыре недели после введения однократной дозы, тогда как введение конструкций в дозе 1 мг/кг приводило к приблизительно 70% снижению экспрессии PNPLA3 человека в печени через четыре недели после введения однократной дозы. Доза 1 мг/кг была достаточной для поддержания более чем 55% снижения экспрессии PNPLA3 в течение шести недель после введения однократной дозы. Введение однократной дозы 3 мг/кг конструкций для RNAi приводило к снижению экспрессии в печени PNPLA3 человека, составляющему 90% или больше, через четыре недели после введения однократной дозы. Экспрессия PNPLA3 человека в печени все еще была снижена на приблизительно 75% или больше через шесть недель после введения дозы 3 мг/кг. Повышенную эффективность и продолжительность нокдауна гена наблюдали в случае конструкций для RNAi, имеющих две различные последовательности, что свидетельствует о том, что паттерн химических модификаций P9 является эффективным для стабилизации конструкций для RNAi по меньшей мере отчасти независимо от последовательности нуклеиновых оснований.

[232] Затем эффективность конструкций для RNAi PNPLA3, имеющих паттерн химических модификаций P9, *in vivo* сравнивали с конструкциями для RNAi PNPLA3, имеющими один из трех различных контрольных паттернов модификаций. Ранее сообщалось, что паттерны модификаций CM2, CM3 и CM4 увеличивают метаболическую стабильность молекул siRNA, что приводит к повышению эффективности и продолжительности сайленсинга генов. См. Foster *et al.*, Molecular Therapy, Vol. 26: 708-717, 2018. Все конструкции для RNAi имели одинаковые коровые нуклеотидные последовательности в смысловой и антисмысловой нитях и отличались только паттерном

химических модификаций. Синтезировали две различные конструкции, имеющие паттерн модификаций P9 - одну с инвертированным нуклеотидом с удаленным азотистым основанием на 3'-конце смысловой нити (дуплекс № 7318), а другую с инвертированным дезокситимидином на 3'-конце смысловой нити (дуплекс № 8709). Также синтезировали конструкции для RNAi, имеющие один из паттернов модификаций CM2, CM3 или CM4 (дуплексы №№ 8103, 8104 и 8105 соответственно). Затем каждую из конструкций для RNAi вводили подкожно мышам, экспрессирующим гуманизированный вариант гена *PNPLA3^{rs738409-rs738408}*, в дозе 3 мг/кг. Уровни экспрессии PNPLA3 человека в печени оценивали с помощью qPCR через 28 дней после введения конструкций для RNAi. Результаты показаны на фиг. 5. Конструкция для RNAi, имеющая паттерн модификаций P9 с инвертированным нуклеотидом с удаленным азотистым основанием на 3'-конце смысловой нити (дуплекс № 7318), приводила к самому большому снижению экспрессии PNPLA3 в печени среди всех протестированных конструкций. Конструкция для RNAi, имеющая паттерн модификаций P9 с инвертированным дезокситимидином на 3'-конце смысловой нити (дуплекс № 8709), приводила к большему снижению экспрессии PNPLA3 в печени, чем конструкция, имеющая паттерн CM4 (дуплекс № 8105), и сопоставимые снижения экспрессии PNPLA3 в печени с конструкциями, имеющими паттерны CM2 и CM3 (дуплексы №№ 8103 и 8104 соответственно).

[233] В отдельной серии экспериментов разработали альтернативные варианты паттерна модификаций P3 и оценили их в отношении эффективности *in vivo* на гуманизированной мышинной модели PNPLA3. Варианты паттерна P3 применили к конструкциям для RNAi с двумя разными последовательностями. Последовательности смысловой и антисмысловой нитей для каждой из конструкций для RNAi показаны в таблице 1, а паттерны модификаций показаны схематически на фиг. 1. Конструкции для RNAi вводили подкожно мышам, экспрессирующим гуманизированный вариант гена *PNPLA3^{rs738409-rs738408}*, в дозе 3 мг/кг. Уровни экспрессии PNPLA3 человека в печени оценивали с помощью qPCR через 28 дней после введения конструкций для RNAi. Результаты показаны в таблице 3 ниже. Все конструкции для RNAi приводили к снижению экспрессии PNPLA3 человека в печени, составляющему приблизительно 90% или больше, через четыре недели после однократной подкожной инъекции в дозе 3 мг/кг.

Таблица 3. Эффективность конструкций для RNAi PNPLA3 с альтернативными паттернами химических модификаций *in vivo*

№ дуплекса	Обозначение паттерна	Обозначение семейства последовательностей	Среднее значение относительного нокдауна в день 28 (n=4)	Стандартная ошибка
6883	P3	T5,1	-89,28	2,29
7319	P9	T5,1	-95,93	0,91

7464	P10	T5,1	-90,63	1,52
7463	P11	T5,1	-93,78	0,90
7470	P15	T5,1	-90,58	2,70
7466	P16	T5,1	-95,25	0,26
7469	P17	T5,1	-95,43	0,78
7064	P3	T23	-95,67	1,42
7576	P11	T23	-89,20	1,90
7580	P12	T23	-93,68	1,29
7579	P18	T23	-91,35	1,84

Пример 2. Активность конструкций для RNAi ASGR1 с различными паттернами химических модификаций in vivo

[234] Как показано в примере 1, паттерн химических модификаций P1, примененный к 13 разным конструкциям для RNAi с разными последовательностями, нацеливающимися на мРНК *PNPLA3* человека, улучшала эффективность сайленсинга гена у конструкций. Чтобы исследовать, будет ли паттерн химических модификаций P1 увеличивать эффективность конструкций для RNAi, нацеливаемых на другой ген печени, синтезировали конструкцию для RNAi, нацеливающуюся на мРНК асиалогликопротеинового рецептора 1 (ASGR1), с паттерном химических модификаций P1 в соответствии со способами, описанными в примере 1. Конструкцию для RNAi, имеющую такую же последовательность, синтезировали с контрольным паттерном химических модификаций CM1. Последовательности конструкций для RNAi представлены ниже в таблице 4 с использованием тех же обозначений, которые описаны выше для таблицы 1. GalNAc-фрагмент со структурой, показанной в формуле VII, конъюгировали с 5'-концом смысловой нити конструкции для RNAi, обозначенной как дуплекс № 1520, и GalNAc-фрагмент со структурой, показанной в формуле IX, конъюгировали с 5'-концом смысловой нити конструкции для RNAi, обозначенной как дуплекс № 1421. Конъюгацию GalNAc-фрагментов со смысловыми нитями конструкций для RNAi проводили, как описано в примере 1, за исключением того, что в случае GalNAc-фрагмента со структурой, показанной в формуле IX, GalNAc-фрагмент получали следующим образом. К раствору 2-(2-(2-(2-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-ацетамидо-4,5-диацетокси-6-(ацетоксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этокси)этокси)уксусной кислоты (5,37 г, 10 ммоль) в DMF (40 мл) добавляли TATU (3,22 г, 10 ммоль) и раствор перемешивали в течение 5 мин. К раствору добавляли DIEA (2,96 мл, 17 ммоль), а затем смесь добавляли к смоле, описанной в примере 1 выше. Суспензию выдерживали при комнатной температуре на протяжении ночи и растворитель сливали. Смолу промывали с помощью DMF (3×30 мл) и DCM (3×30 мл).

Таблица 4. Иллюстративные модифицированные конструкции для RNAi ASGR1

№ дуплекса	Обозначение паттерна	GalNAc-фрагмент	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
1421	CM1	Формула IX	GfuGfgGfaAfgAfAfAfgAfuGfaAfgUfsusUf	81	{Phos}asCfsuUfcAfuCfuuuCfuUfcCfcAfcUfsu	83
1520	P1	Формула VII	gugggaAfgAfAfAfGfaugaagususu	82	{Phos}asCfsuUfcAfUfcuuuCfuUfcccacsusu	84

[235] Эффективность конструкций для RNAi *in vivo* в подавлении экспрессии ASGR1 в печени мышей оценивали путем введения конструкций для RNAi мышам C57BL/6J. Животных C57BL/6 дикого типа возрастом 10-12 недель (Charles River) кормили стандартной кормом (экструдированный рацион для грызунов, не содержащий соевого белка, 2020× Teklad global; Harlan). Мышам вводили подкожную инъекцию буфера или указанной конструкции для RNAi в дозе 5 мг/кг массы тела в 0,25 мл буфера в день 0 (n=9 на группу). Для дальнейшего анализа отбирали трех животных в день 4, трех животных в день 8 и трех животных в день 15. Общую РНК образцов печени у отобранных животных обрабатывали для анализа qPCR. Эффективность конструкции для RNAi оценивали путем сравнения количества мРНК *Asg1* в ткани печени у животных, обработанных конструкцией для RNAi, с количеством мРНК *Asg1* в ткани печени у животных, которым вводили инъекцией буфер. Результаты показывают, что животные, получившие конструкцию для RNAi, имеющую паттерн модификаций P1 (дуплекс № 1520), демонстрировали большее снижение экспрессии ASGR1 в печени, чем животные, получившие конструкцию для RNAi, имеющую контрольный паттерн модификаций CM1, во все измеренные моменты времени (фиг. 6). Подобно результатам, описанным в примере 1 с конструкциями для RNAi, нацеливающимися на мРНК PNPLA3 человека, паттерн химических модификаций P1 улучшает эффективность конструкций для RNAi.

Пример 3. Активность конструкций для RNAi LPA с различными паттернами химических модификаций *in vivo*

[236] Для дополнительной оценки способности паттернов химических модификаций, описанных в данном документе, улучшать эффективность конструкций для RNAi *in vivo*, синтезировали конструкции для RNAi, нацеливающиеся на третий ген печени, ген *LPA*, и конъюгировали с GalNAc-фрагментом со структурой, показанной в формуле VII, в соответствии со способами, описанными в примере 1. Последовательности конструкций для RNAi представлены ниже в таблице 5 с использованием тех же обозначений, которые описаны выше для таблицы 1. В таблице 5 также перечислено обозначение паттернов и обозначение семейств последовательностей для каждой конструкции для RNAi. Обозначения паттернов схематически представлены на фиг. 1. Если конструкция для RNAi имеет то же обозначение семейства последовательностей, что и другая конструкция для RNAi, то эти две конструкции имеют одинаковую коровую последовательность, но отличаются паттерном химических модификаций.

Таблица 5. Иллюстративные модифицированные конструкции для RNAi LPA

№ дуплекса	Обозначение паттерна	Обозначение семейства последовательностей	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	АНТИСМЫСЛОВАЯ последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
3632	CM1	T101	GfcCfcCfuUfaUfUfGfu UfaUfaCfGfAfsusUf	85	{Phos}usCfsgUfaUfaAfca aUfaAfgGfgGfcsUfsu	107
3635	P1	T101	gccccuUfaUfUfGfUfua uacgasusu	86	{Phos}usCfsgUfaUfAfac aUfaAfggggcsusu	108
4973	P1	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgac gcagsusu	87	{Phos}csUfsgCfGfUfCfuga gCfaUfugugususu	109
6248	P4	T102	[invAb]ugacacaaUfgCf UfCfAfgacgcsasg	88	{Phos}csUfsgCfGfUfCfuga gCfaUfugugucasusu	110
7934	P19	T102	ugacacAfaUfGfCfUfca gacgcas[invAb]	89	usUfsgCfGfUfCfUfGfagcaUf uGfugucasusu	111
10927	P27	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgac gcaaus[invAb]	90	usUfsgcguCfugagCfaUfug ugususu	112
11351	P28	T102	acacaaUfgCfUfCfAfgac gcas[invAb]	91	usUfsgcguCfugagCfaUfug ugususu	112
4601	P1	T103	ccuagaGfgCfUfCfCfu cugaasusu	92	{Phos}usUfscAfgAfAfgga gCfcUfcuaggsusu	113
6247	P6	T103	agccuagaGfgCfUfCfCf uucugsasa	93	{Phos}usUfscAfgAfAfgga gCfcUfcuaggsusu	114
8336	P10	T104	[invAb]uucgccccUfgGf UfGfUfuacacscsa	94	usGfsguguAfacacCfaAfgg gccaasusu	115
11313	P25	T104	[invAb]cgccccUfGfGf Ufguuacaccasusu	95	usGfsguguAfacacCfaAfgg gcgsusu	116
11318	P22	T104	[invAb]cgccccUfGfGf Ufguuacacscsa	96	usGfsguguAfacaccaAfgGf gcgsusu	117
11372	P19	T105	cagaauCfaAfgGfUfGfuc cuugcas[invAb]	97	usUfsgCfaAfgGfAfcacuUf gAfuucugsusu	118
17183	P25	T105	[invAb]gaaucAfgGfUf	98	usUfsgcaaGfgacaCfuUfga	119

			Gfuccuugcaasusu		uucsusu	
18444	P30	T105	cagaaucaAfGfUfGfuccu ugcas[invAb]	99	usUfsgcaaGfgacaCfuUfga uucsusg	120
11580	P27	T106	aaucaaGfuGfUfCfCfu gcaauus[invAb]	100	asUfsugcaAfggacAfcUfug auususu	121
18436	P29	T106	agaaucaaGfuGfUfCfCf uugcaas[invAb]	101	asUfsugcaAfggacAfcUfug auuscsu	122
8395	P19	T107	agucuuGfgUfCfCfUfcu augacas[invAb]	102	asUfsgUfcAfuAfGfaggaCf cAfagacususu	123
8401	P9	T107	agucuuaggUfcCfUfCfUf augacas[invAb]	103	asUfsgucaUfagagGfaCfcaa gacususu	124
11344	P24	T107	agucuuGfgUfCfCfUfcu augacas[invAb]	102	asUfsgUfcAfuagaggaCfcA fagacususu	125
4995	P1	T108	uucugaAfgAfAfGfCfac caacususu	104	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcu uCfuUfcagaasusu	126
6182	P2	T108	[invAb]uucugaAfgAfAf GfCfaccacususu	105	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcu uCfuUfcagaasusu	126
6150	P7	T108	[invAb]ccuucugaAfgAf AfGfCfaccacs[invAb]	106	{Phos}asGfsuUfgGfUfgcu uCfuUfcagaaggsusu	127

[237] В первоначальном эксперименте синтезировали конструкции для RNAi с одинаковой нуклеотидной последовательностью, которые имели либо контрольный паттерн химических модификаций CM1 (дуплекс № 3632), либо паттерн химических модификаций P1 (дуплекс № 3635). Эффективность двух конструкций *in vivo* оценивали на модели дважды трансгенных мышей, которые экспрессируют полностью функциональную частицу Lp(a) человека, при этом уровни Lp(a) в сыворотке крови на исходном уровне составляют приблизительно 50-60 мг/дл в среднем. Lp(a) представляет собой липопротеин низкой плотности, состоящий из частицы LDL и гликопротеина аполипопротеина (a) (apo(a)), который связан с аполипопротеином В частицы LDL за счет дисульфидной связи. Apo(a) кодируется геном *LPA*, и изменения уровней Lp(a) в сыворотке крови отражают изменения в экспрессии гена *LPA*. Дважды трансгенных мышей получали путем скрещивания трансгенных мышей, экспрессирующих apo(a) человека с дрожжевой искусственной хромосомы (YAC), содержащей полный ген *LPA* человека (Frazer *et al.*, Nature Genetics, Vol. 9: 424-431, 1995), с трансгенными мышами, экспрессирующими apoB-100 человека (Linton *et al.*, J. Clin. Invest., Vol. 92: 3029-3037, 1993). Конструкции для RNAi *LPA* вводили в виде однократной подкожной инъекции в дозе 0,5 мг/кг. Образцы сыворотки крови собирали перед инъекцией, а затем после инъекции в день 14 и день 28. Концентрации Lp(a) измеряли в сыворотке крови с использованием анализа ELISA Lp(a)

(№ по кат. 10-1106-01, Mercodia AB, Уппсала, Швеция). Процентное изменение уровня Lp(a) для каждого животного в конкретный момент времени рассчитывали, исходя из уровня Lp(a) у этого животного на исходном уровне. Результаты показаны на фиг. 7. Через две недели после инъекции введение дуплекса № 3635, который имел паттерн модификаций P1, приводило к большему среднему снижению уровней Lp(a) в сыворотке крови (-49%) по сравнению с дуплексом № 3632 (-35%), имевшим контрольный паттерн модификаций SM1, хотя отличие и не было статистически значимым.

[238] Во второй серии экспериментов синтезировали конструкции для RNAi LPA, нацеливающиеся на области мРНК LPA, отличные от тех, которые использовались в первой серии экспериментов, с использованием паттерна химических модификаций P1 или вариантов этого паттерна. Конструкции для RNAi с новыми паттернами оценивали на модели дважды трансгенных мышей с точки зрения улучшений как величины, так и продолжительности подавления экспрессии гена *LPA in vivo*. В частности, конструкции для RNAi LPA из трех различных семейств последовательностей, имеющих паттерн модификаций P1 или один из вариантов паттерна (например, паттерны химических модификаций P2, P4, P6 или P7), вводили подкожно дважды трансгенным мышам, описанным выше, в дозе 2 мг/кг. Уровни Lp(a) в сыворотке крови измеряли у животных перед инъекцией для получения уровней на исходном уровне и на неделях 1, 2 и 4 после введения конструкций для RNAi LPA. Результаты данной серии экспериментов показаны в таблице 6 ниже. Среди трех семейств последовательностей конструкции для RNAi, имеющие паттерны модификаций P2, P4, P6 или P7, приводили к большему снижению и продолжительности подавления уровней Lp(a) в сыворотке крови по сравнению с конструкциями для RNAi, имеющими паттерн модификаций P1. Конструкции для RNAi, имеющие паттерны химических модификаций P6 или P7, приводили снижению уровней Lp(a) в сыворотке крови, составляющему к более 80%, вплоть до 4 недель после однократной подкожной инъекции в дозе 2 мг/кг.

Таблица 6. Эффективность конструкций для RNAi LPA in vivo

№ дуплекса	Обозначение паттерна	Обозначение семейства последовательностей	Процентное изменение содержания Lp(a) в сыворотке крови от исходного уровня (среднее значение ± SEM)		
			Неделя 1	Неделя 2	Неделя 4
4973	P1	T102	-66 ± 6%	-73 ± 7%	16 ± 21%
6248	P4	T102	-73 ± 12%	-78 ± 10%	-37 ± 15%

4601	P1	T103	-92 ± 2%	-95 ± 1%	-76 ± 3%
6247	P6	T103	-93 ± 2%	-95 ± 1%	-86 ± 1%
4995	P1	T108	-70 ± 12%	-70 ± 12%	14 ± 33%
6182	P2	T108	-87 ± 1%	-82 ± 5%	-45 ± 7%
6150	P7	T108	-92 ± 2%	-93 ± 2%	-83 ± 1%

[239] Затем разработали альтернативные варианты паттернов химических модификаций и оценили их эффективность *in vivo* на модели дважды трансгенных мышей. Варианты паттернов химических модификаций применили к конструкциям для RNAi с последовательностями из пяти различных семейств последовательностей. Последовательности смысловой и антисмысловой нитей для каждой из конструкций для RNAi представлены в таблице 5, а паттерны модификаций показаны схематически на фиг. 1. Конструкции для RNAi вводили подкожно дважды трансгенным мышам, экспрессирующим частицы Lp(a) человека, в дозе 1 мг/кг. Уровни Lp(a) в сыворотке крови измеряли у животных перед инъекцией для получения уровней на исходном уровне и на неделях 2, 3 и 4 после введения конструкций для RNAi LPA. Результаты показаны в таблице 7 ниже. Некоторые варианты паттернов, такие как P9, P19, P22, P24, P27, P28 и P29, приводили к снижению уровней Lp(a) в сыворотке крови, составляющим более 50%, через четыре недели после однократной подкожной инъекции в дозе 1 мг/кг. Конструкции для RNAi, имеющие паттерн химических модификаций P27, были особенно эффективны в подавлении уровней Lp(a) в сыворотке крови, поскольку данные конструкции приводили к устойчивому снижению уровней Lp(a), составляющему приблизительно 75%, через четыре недели после однократной инъекции.

Таблица 7. Эффективность конструкций для RNAi LPA с альтернативными паттернами химических модификаций *in vivo*

№ дуплекса	Обозначение паттерна	Обозначение семейства последовательностей	Среднее процентное изменение содержания Lp(a) в сыворотке крови от исходного уровня		
			Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4
7934	P19	T102	-77%	-76%	-28%
10927	P27	T102	-92%	-85%	-77%
11351	P28	T102	-85%	-89%	-68%
8336	P10	T104	-39%	-59%	-16%
11318	P22	T104	-64%	-81%	-64%
11313	P25	T104	-51%	-54%	+3

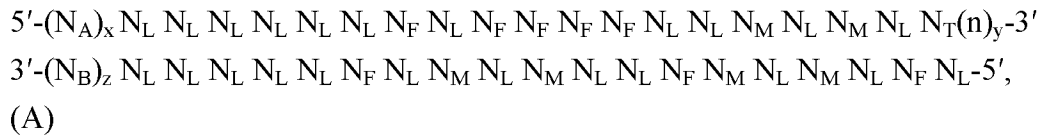
11372	P19	T105	-72%	-75%	-13%
17183	P25	T105	-56%	-37%	-16%
18444	P30	T105	-75%	-70%	-44%
11580	P27	T106	-86%	-78%	-74%
18436	P29	T106	-87%	-80%	-63%
8401	P9	T107	-90%	-82%	-58%
8395	P19	T107	-79%	-84%	-59%
11344	P24	T107	-87%	-75%	-67%

[240] Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Необходимо понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретной описанной методологией, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, необходимо понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Специалистам в данной области будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охвачены приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для RNAi, которая подавляет экспрессию последовательности целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (A):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или

немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

2. Конструкция для RNAi по п. 1, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет от 19 до 30 нуклеотидов.

3. Конструкция для RNAi по п. 1, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет от 19 до 25 нуклеотидов.

4. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 0, y составляет 2, и z составляет 2.

5. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 1, и N_A представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 2, и z составляет 2.

6. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 2, y составляет 0, и z составляет 4.

7. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 2, y составляет 0, и z составляет 2.

8. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 3, и N_A на 5'-конце представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 0, и z составляет 4.

9. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 0, y составляет 0, и z составляет 2.

10. Конструкция для RNAi по п. 1, где x составляет 1, и N_A представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 0, и z составляет 2.

11. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-10, где N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

12. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-11, где каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

13. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-12, где каждый N_M в положениях 4 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

14. Конструкция для RNAi по п. 13, где N_M в положении 6 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

15. Конструкция для RNAi по п. 14, где N_M в положении 10 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

16. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-12, где каждый N_M в положениях 10 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

17. Конструкция для RNAi по п. 16, где N_M в положении 4 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

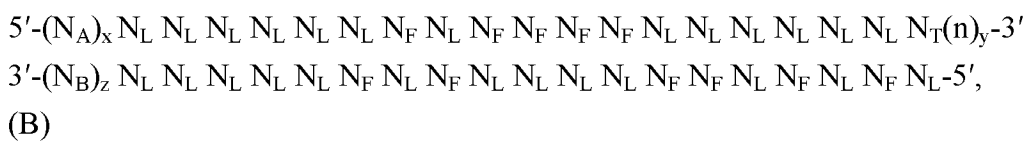
18. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-12, где каждый N_M в положениях 4, 6 и 10 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и N_M в положении 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

19. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-12, где каждый N_M как в смысловой, так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

20. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-18, где каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

21. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-18, где каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

22. Конструкция для RNAi, которая подавляет экспрессию последовательности целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (B):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым

основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

23. Конструкция для RNAi по п. 22, где x составляет 0, y составляет 2, и z составляет 2.

24. Конструкция для RNAi по п. 22, где x составляет 0, y составляет 0, и z составляет 2.

25. Конструкция для RNAi по п. 22, где x составляет 1, и N_A представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 2, и z составляет 2.

26. Конструкция для RNAi по п. 22, где x составляет 2, y составляет 0, и z составляет 4.

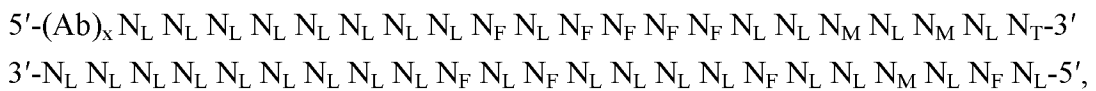
27. Конструкция для RNAi по п. 22, где x составляет 3, и N_A на 5'-конце представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 0, и z составляет 4.

28. Конструкция для RNAi по любому из пп. 22-27, где N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

29. Конструкция для RNAi по любому из пп. 22-28, где каждый N_L как в смысловой,

так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

30. Конструкция для RNAi, которая подавляет экспрессию последовательности целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (C):



(C)

где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида; и

x составляет 0 или 1, и Ab представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием.

31. Конструкция для RNAi по п. 30, где каждый N_M как в смысловой, так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

32. Конструкция для RNAi по п. 31, где N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид, и x составляет 0.

33. Конструкция для RNAi по п. 31, где N_T представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и x составляет 1.

34. Конструкция для RNAi по п. 30, где N_M в антисмысловой нити представляет

собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

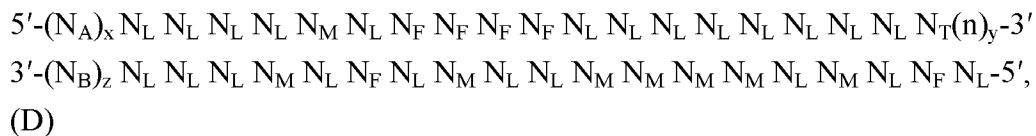
35. Конструкция для RNAi по п. 34, где каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

36. Конструкция для RNAi по п. 34, где каждый N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

37. Конструкция для RNAi по любому из пп. 34-36, где N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием или инвертированный дезоксирибонуклеотид, и x составляет 0.

38. Конструкция для RNAi по любому из пп. 30-37, где каждый N_L как в смысловой, так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

39. Конструкция для RNAi, которая подавляет экспрессию последовательности целевого гена, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит последовательность, комплементарную последовательности целевого гена, а смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок, где конструкция для RNAi содержит структуру, представленную формулой (D):



где:

верхняя нить, указанная в направлении от 5' к 3', представляет собой смысловую нить, а нижняя нить, указанная в направлении от 3' к 5', представляет собой антисмысловую нить;

каждый N_F представляет 2'-фтор-модифицированный нуклеотид;

каждый N_M независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, бициклической нуклеиновой кислоты (BNA) и дезоксирибонуклеотида;

каждый N_L независимо представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

N_T представляет модифицированный нуклеотид, выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида;

x составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если x составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_A представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, инвертированного дезоксирибонуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_A могут быть комплементарны нуклеотидам в антисмысловой нити;

y составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если y составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов n являются модифицированными или немодифицированными нуклеотидами липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в антисмысловой нити; и

z составляет целое число от 0 до 4 при условии, что, если z составляет 1, 2, 3 или 4, один или несколько нуклеотидов N_B представляют собой модифицированный нуклеотид, независимо выбранный из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, BNA и дезоксирибонуклеотида, и один или несколько нуклеотидов N_B могут быть комплементарны нуклеотидам N_A , если они присутствуют в смысловой нити, или могут представлять собой нуклеотиды липких концов, которые не образуют пару оснований с нуклеотидами в смысловой нити.

40. Конструкция для RNAi по п. 39, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет от 19 до 30 нуклеотидов.

41. Конструкция для RNAi по п. 39, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити независимо составляет от 19 до 25 нуклеотидов.

42. Конструкция для RNAi по п. 39, где x составляет 2, y составляет 0, и z составляет 4.

43. Конструкция для RNAi по п. 39, где x составляет 1, и N_A представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 2, и z составляет 2.

44. Конструкция для RNAi по п. 39, где x составляет 1, и N_A представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, y составляет 0, и z составляет 2.

45. Конструкция для RNAi по п. 39, где x составляет 0, y составляет 0, и z составляет 2.

46. Конструкция для RNAi по п. 39, где x составляет 2, y составляет 0, и z составляет 2.

47. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-46, где N_T представляет собой инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, инвертированный дезоксирибонуклеотид или 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

48. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-47, где каждый N_L как в смысловой,

так и в антисмысловой нитях представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

49. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-48, где каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

50. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-48, где каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

51. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-48, где каждый N_M в положениях 4, 6, 8, 9 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 7 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

52. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-48, где каждый N_M в положениях 7, 8, 9 и 12 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, и каждый N_M в положениях 4, 6 и 16 в антисмысловой нити, считая от 5'-конца, представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

53. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-52, где N_M в смысловой нити представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид.

54. Конструкция для RNAi по любому из пп. 39-52, где N_M в смысловой нити представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

55. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-54, где смысловая нить, антисмысловая нить или как смысловая, так и антисмысловая нити содержат одну или несколько фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

56. Конструкция для RNAi по п. 55, где антисмысловая нить содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами как на 3'-, так и на 5'-концах.

57. Конструкция для RNAi по п. 55 или п. 56, где смысловая нить содержит одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь между терминальными нуклеотидами на 3'-конце.

58. Конструкция для RNAi по п. 55 или п. 56, где смысловая нить содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между терминальными нуклеотидами на 3'-конце.

59. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-58, где конструкция для RNAi дополнительно содержит лиганд.

60. Конструкция для RNAi по п. 59, где лиганд предусматривает холестеринный фрагмент, витамин, стероид, желчную кислоту, фолатный фрагмент, жирную кислоту, углевод, гликозид или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

61. Конструкция для RNAi по п. 59, где лиганд нацеливает доставку конструкции

для RNAi в гепатоциты.

62. Конструкция для RNAi по п. 59, где лиганд предусматривает галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

63. Конструкция для RNAi по п. 62, где лиганд предусматривает мультивалентный галактозный фрагмент или мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент.

64. Конструкция для RNAi по п. 63, где мультивалентный галактозный фрагмент или мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент являются трехвалентными или четырехвалентными.

65. Конструкция для RNAi по любому из пп. 59-64, где лиганд ковалентно присоединен к смысловой нити необязательно через линкер.

66. Конструкция для RNAi по п. 65, где лиганд ковалентно присоединен к 5'-концу смысловой нити.

67. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию для RNAi по любому из пп. 1-66 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

68. Способ подавления экспрессии целевого гена в клетке, включающий приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi по любому из пп. 1-66.

69. Способ по п. 68, где клетка находится *in vivo*.

70. Способ подавления экспрессии целевого гена у субъекта, включающий введение субъекту конструкции для RNAi по любому из пп. 1-66.

71. Способ по п. 70, где конструкцию для RNAi вводят субъекту посредством парентерального пути введения.

По доверенности

Фиг. 1

Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна
CM1	<p>● = 2'-OMe ^ = фосфотиоатная связь ⊖ = 2'-F ^ = фосфодиэфирная связь ○ = invAb/invdN</p>
CM2	
CM3	
CM4	
P1	

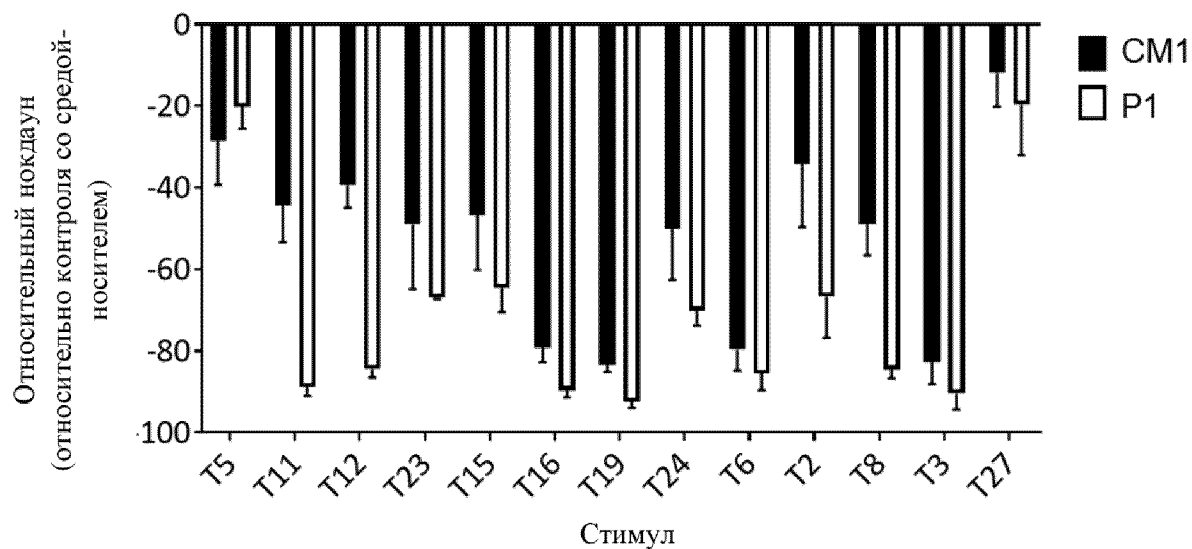
Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна <ul style="list-style-type: none"> ● = 2'-OMe ⊖ = 2'-F ○ = invAb/invdN ∧ = фосфоротиоатная связь ∧ = фосфодиэфирная связь
P2	
P3	
P4	
P5	
P6	
P7	

Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна <p>● = 2'-OMe ^ = фосфотиоатная связь ⊖ = 2'-F ^ = фосфодизфирная связь ○ = invAb/invdN</p>
P8	
P9	
P10	
P11	
P12	
P13	

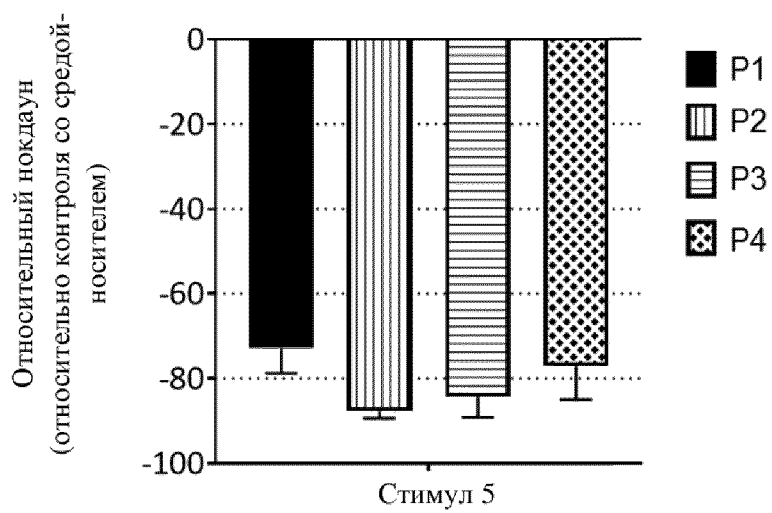
Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна <ul style="list-style-type: none"> ● = 2'-OMe ⊖ = 2'-F ○ = invAb/invdN ∧ = фосфотиоатная связь ∧ = фосфодиэфирная связь
P14	
P15	
P16	
P17	
P18	
P19	

Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна <ul style="list-style-type: none"> ● = 2'-OMe ⊖ = 2'-F ○ = invAb/invdN ∧ = фосфоротиоатная связь ∧ = фосфодиэфирная связь
P20	
P21	
P22	
P23	
P24	
P25	

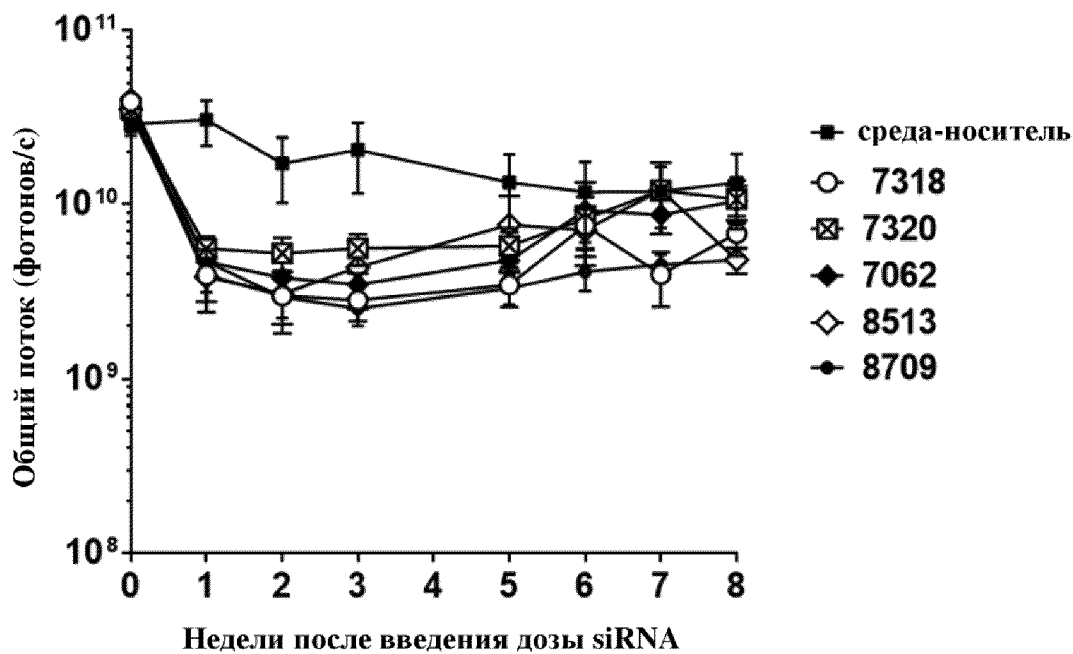
Номер обозначения паттерна	Схематическое изображение паттерна <p>● = 2'-OMe ▲ = фосфотиоатная связь ⊖ = 2'-F ▲ = фосфодиэфирная связь ○ = invAb/invdN</p>
P26	
P27	
P28	
P29	
P30	



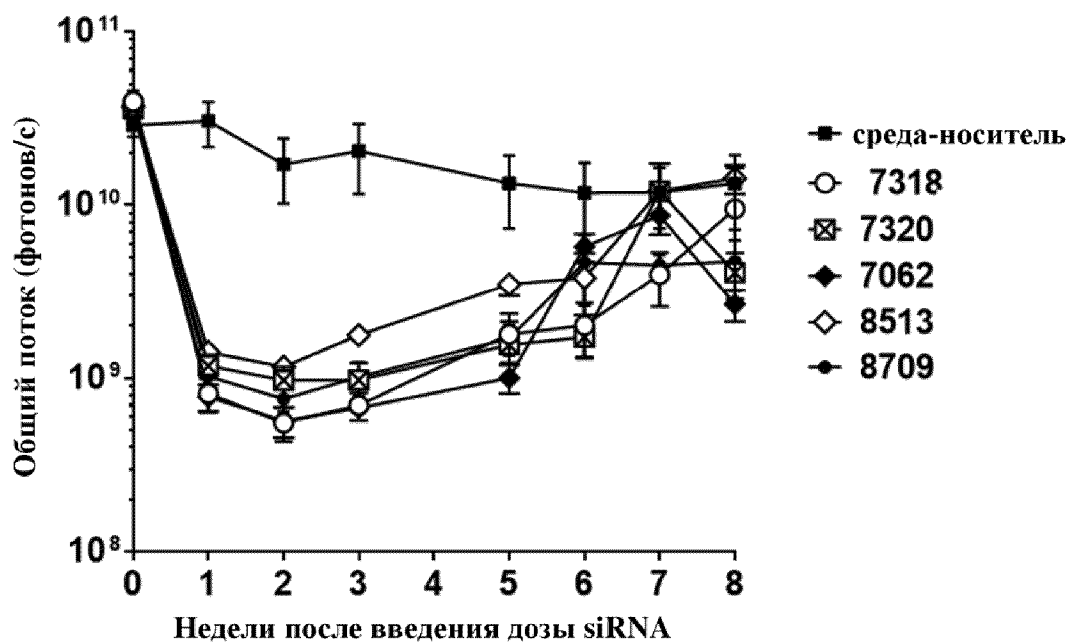
Фиг. 2



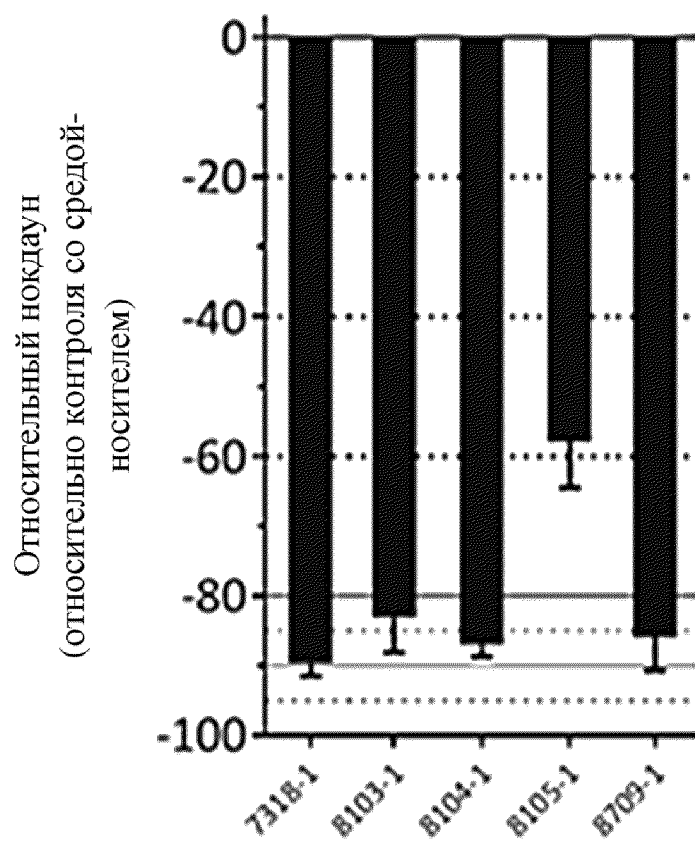
Фиг. 3



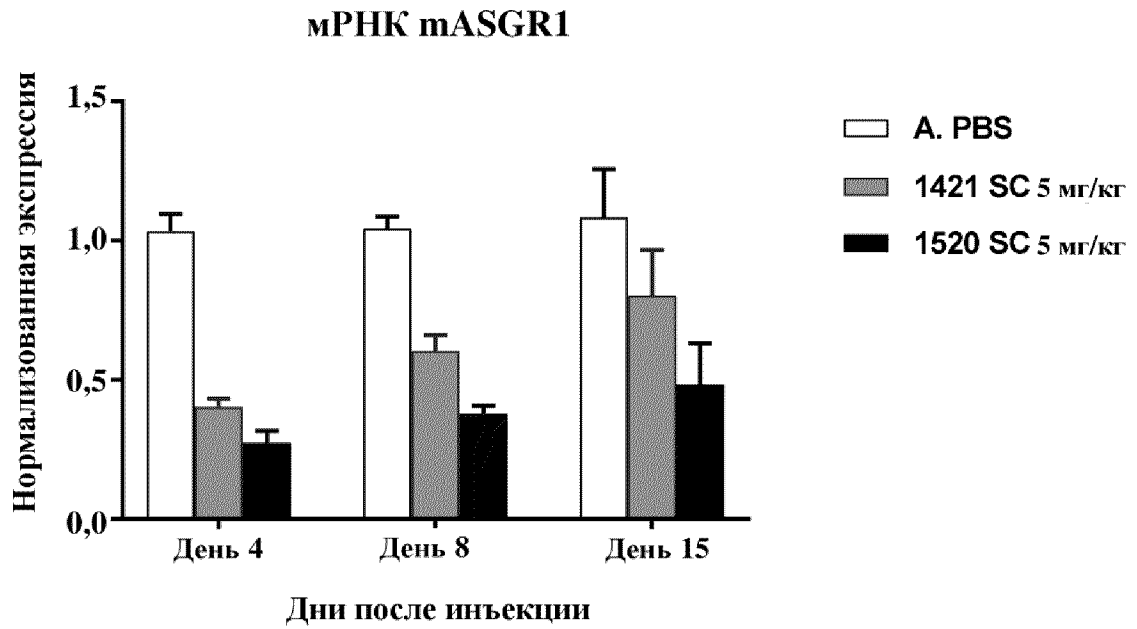
Фиг. 4А



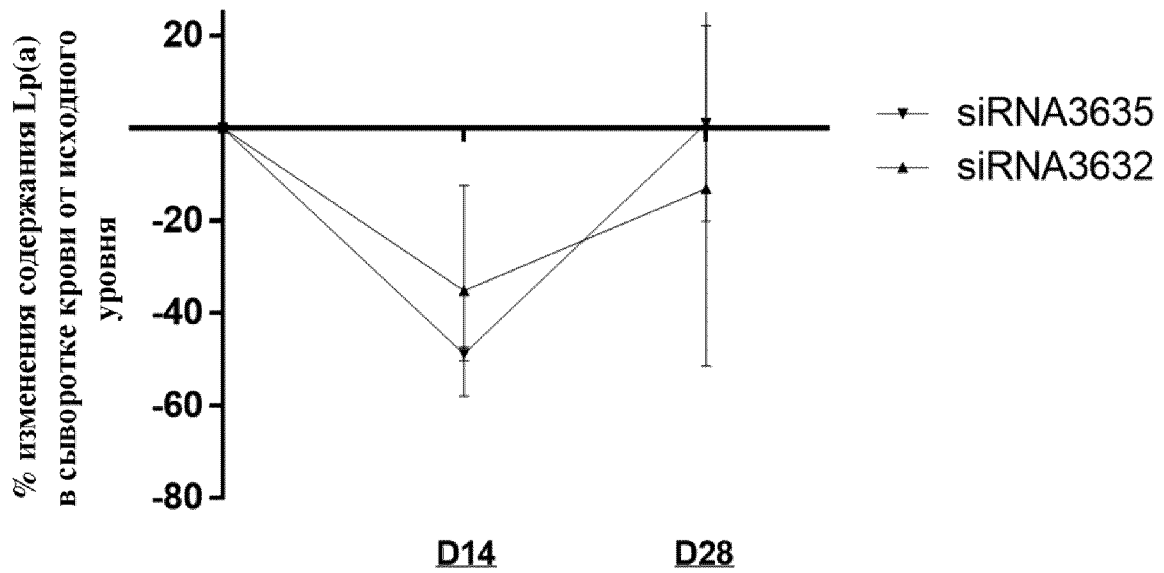
Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7