

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191313** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.01.26

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.11.08

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

(31) **62/758,088**

(32) **2018.11.09**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/060582**

(87) **WO 2020/097540 2020.05.14**

(71) Заявитель:
**АРБУТУС БИОФАРМА
КОРПОРЭЙШН (СА)**

(72) Изобретатель:

**Хейес Джеймс, Джадж Адам, Лам
Киэу Монг, Палмер Лорн Ральф,
Шрейнер Петра (СА)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к определенным специфичным липидным наночастицам, содержащим (a) одну или более молекул нуклеиновой кислоты; (b) холестерин; (c) DSPC; (d) ПЭГ-С-DMA; и (e) катионный липид; и фармацевтическим композициям, содержащим липидные наночастицы. Липидные наночастицы и фармацевтические композиции особенно полезны для доставки нуклеиновых кислот, таких как миРНК или мРНК, пациенту (например, человеку) или в клетку.

A1

202191313

202191313

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568756EA/019

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ(И)

Настоящая патентная заявка испрашивает приоритет по заявке на патент США № 62/758 088, поданной 09 ноября 2018 г., раскрытие которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Липидные наночастицы (LNP) представляют собой эффективные системы доставки лекарственных средств для биологически активных соединений, таких как терапевтические нуклеиновые кислоты, белки и пептиды, которые в противном случае являются непроницаемыми для клеток. Лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот, которые содержат большие молекулы нуклеиновых кислот, такие как, *например*, транскрибируемая матричная РНК (мРНК) *in vitro*, а также более мелкие полинуклеотиды, которые взаимодействуют с матричной РНК или геном, должны быть доставлены в соответствующий клеточный компартмент, чтобы быть эффективными. Например, двухцепочечные нуклеиновые кислоты, такие как молекулы двухцепочечной РНК (дцРНК), включая, *например*, миРНК, страдают от своих физико-химических свойств, которые делают их непроницаемыми для клеток. При доставке в соответствующий компартмент миРНК блокируют экспрессию генов с помощью высококонсервативного регуляторного механизма, известного как РНК-интерференция (РНКи). Как правило, миРНК имеют большой размер с молекулярной массой от 12 до 17 кДа и являются высокоанионными из-за их фосфатного остова, содержащего до 50 отрицательных зарядов. Кроме того, две комплементарные цепи РНК образуют жесткую спираль. Эти признаки способствуют ненадлежащим «лекарственным» свойствам миРНК. При внутривенном введении миРНК быстро выводится из организма с типичным периодом полувыведения всего 10 минут. Кроме того, миРНК быстро разрушаются нуклеазами, присутствующими в крови и других жидкостях или в тканях, и было показано, что они вызывают сильные иммунные ответы *in vitro* и *in vivo*. См., *например*, Robbins et al., *Oligonucleotides* 19:89-102, 2009. Молекулы мРНК страдают от аналогичных проблем непроницаемости, хрупкости и иммуногенности. (WO2016/118697)

Композиции на основе липидных наночастиц улучшили доставку нуклеиновых кислот *in vivo*. Например, такие композиции имеют значительно сниженные дозы миРНК, необходимые для достижения целевого блокирования *in vivo*. См., Zimmermann et al., *Nature* 441:111-114, 2006. Как правило, такие системы доставки лекарственного средства в виде липидных наночастиц представляют собой многокомпонентные композиции, содержащие катионные липиды, липиды-помощники и липиды, содержащие полиэтиленгликоль. Положительно заряженные катионные липиды связываются с анионной нуклеиновой кислотой, в то время как другие компоненты поддерживают стабильную самосборку липидных наночастиц.

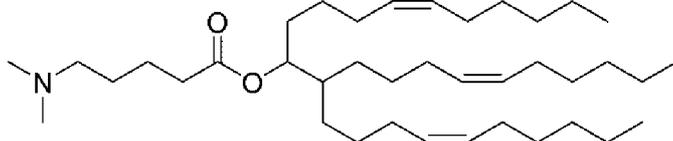
Усилия были направлены на повышение эффективности доставки композиций на основе липидных наночастиц. Многие из таких усилий были направлены на разработку более подходящих катионных липидов. См., например, Akinc et al., Nature Biotechnology 26:561-569, 2008; Love et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:1864-1869, 2010; Baigude et al., Journal of Controlled Release 107:276-287, 2005; Semple et al., Nature Biotechnology 28:172-176, 2010. Несмотря на эти усилия, остается потребность в композициях, содержащих липидные наночастицы, которые обеспечивают высокую эффективность после введения и позволяют вводить более низкие дозы нуклеиновых кислот.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к определенным специфичным липидным наночастицам и фармацевтическим композициям, содержащим липидные наночастицы. Липидные наночастицы и фармацевтические композиции особенно пригодны для доставки нуклеиновой кислоты пациенту (например, человеку) или в клетку.

Соответственно, в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает липидную наночастицу по изобретению, которая представляет собой липидную наночастицу, содержащую:

- (a) одну или более молекул нуклеиновой кислоты;
- (b) холестерин;
- (c) DSPC;
- (d) ПЭГ-С-DMA; и
- (e) катионный липид формулы:

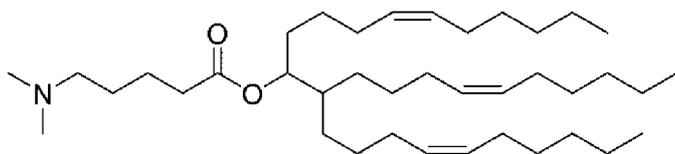


или ее соль, где молярный процент от общего липида для ПЭГ-С-DMA, катионного липида, холестерина и DSPC является следующим:

- ПЭГ-С-DMA: около 1,5;
- катионные липиды: около 50,0;
- холестерин: около 38,5; и
- DSPC: около 10,0.

В одном варианте осуществления изобретение предусматривает липидную наночастицу по изобретению, которая представляет собой липидную наночастицу, содержащую:

- (a) одну или более молекул нуклеиновой кислоты;
- (b) холестерин;
- (c) DSPC;
- (d) ПЭГ-С-DMA; и
- (e) катионный липид формулы:



или ее соль, где молярный процент от общего липида для ПЭГ-С-DMA, катионного липида, холестерина и DSPC является следующим:

ПЭГ-С-DMA: 1,5;

катионные липиды: 50,0;

холестерин: 38,5; и

DSPC: 10,0.

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая липидные наночастицы данного изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении также предусмотрен способ доставки нуклеиновой кислоты в клетку, включающий приведение клетки в контакт с липидной наночастицей по изобретению. В целом, настоящее изобретение относится к способам введения нуклеиновых кислот в живую клетку *in vivo* или *in vitro*.

В изобретении также предлагается способ лечения заболевания, характеризующегося генетическим нарушением, которое приводит к дефициту функционального белка, включающий: введение субъекту с заболеванием липидной наночастицы по изобретению, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, кодирующую функциональный белок или белок, обладающий такой же биологической активностью, что и функциональный белок.

В изобретении также предлагается способ лечения заболевания, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида, включающий введение субъекту с заболеванием липидной наночастицы по изобретению, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой миРНК, которая нацелена на экспрессию сверхэкспрессируемого полипептида.

Изобретение также предлагает липидную наночастицу по изобретению для терапевтического или профилактического лечения заболевания, характеризующегося генетическим нарушением, которое приводит к дефициту функционального белка..

Настоящее изобретение также обеспечивает липидную наночастицу по изобретению для терапевтического или профилактического лечения заболевания, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида.

В изобретении также предложен способ лечения заболевания или расстройства у животного, включающий введение животному терапевтически эффективного количества липидной наночастицы согласно изобретению.

В изобретении также предложен способ и промежуточные продукты, которые можно использовать для получения липидных наночастиц согласно настоящему изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В контексте данного документа, следующие термины имеют присвоенные им значения, если не указано иное.

Термин «около» означает $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$.

Термин «интерферирующая РНК» или «иРНК» или «последовательность интерферирующей РНК» относится к одноцепочечной РНК (например, зрелой микроРНК) или двухцепочечной РНК (т.е. дуплексной РНК, такой как миРНК, айРНК или пре-миРНК), которая способна снижать или ингибировать экспрессию целевого гена или последовательности (например, способствуя деградацию или ингибируя трансляцию мРНК, которые комплементарны к последовательности интерферирующей РНК), если интерферирующая РНК находится в той же клетке, что и целевой ген или последовательность. Таким образом, интерферирующая РНК относится к одноцепочечной РНК, которая комплементарна последовательности мРНК-мишени или двухцепочечной РНК, образованной двумя комплементарными цепями или одной самокомплементарной цепью. Интерферирующая РНК может иметь высокую степень сходства или быть полностью тождественной целевому гену или последовательности, или может включать область некомплементарности (т.е., некомплементарный мотив). Последовательность интерферирующей РНК может соответствовать полноразмерному целевому гену или его подпоследовательности.

Интерферирующая РНК включает «малую интерферирующую РНК» или «миРНК», например, интерферирующую РНК длиной около 15-60, 15-50 или 15-40 (дуплекс) нуклеотидов, более типично около 15-30, 15-25, или 19-25 (дуплекс) нуклеотидов в длину, и предпочтительно составляет около 20-24, 21-22 или 21-23 (дуплекс) нуклеотидов в длину (например, каждая комплементарная последовательность двухцепочечной миРНК составляет 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину, предпочтительно около 20-24, 21-22 или 21-23 нуклеотидов в длину, а длина двухцепочечной миРНК составляет около 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 или 19-25 пар оснований в длину, предпочтительно около 18-22, 19-20 или 19-21 пар оснований в длину). Дуплексы миРНК могут содержать 3'-выступающие липкие концы от около 1 до около 4 нуклеотидов или около от 2 до около 3 нуклеотидов и 5'-фосфатные концы. Примеры миРНК включают, без ограничения, двухцепочечную полинуклеотидную молекулу, собранную из двух отдельных цепочечных молекул, где одна цепь является смысловой цепью, а другая - комплементарной антисмысловой цепью; двухцепочечная полинуклеотидная молекула, собранная из одноцепочечной молекулы, где смысловая и антисмысловая области связаны линкером на основе нуклеиновой кислоты или не на основе нуклеиновой кислоты; двухцепочечная полинуклеотидная молекула со шпилькой вторичной структуры, имеющая самокомплементарные смысловые и антисмысловые области; и кольцевую одноцепочечную полинуклеотидную молекулу с двумя или более петлевыми структурами и стержнем, имеющим самокомплементарные смысловые и

антисмысловые области, где кольцевой полинуклеотид можно процессировать *in vivo* или *in vitro* с образованием активной двухцепочечной молекулы миРНК.

Предпочтительно, миРНК синтезированы химическим путем. миРНК также могут быть получены путем расщепления более длинных двухцепочечных РНК (например, двухцепочечных РНК, более крупных, чем около 25 нуклеотидов в длину) РНКазой III *E. coli* или дайсером. Данные ферменты перерабатывают двухцепочечную РНК в биологически активную миРНК (см., например, Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 31:981-987 (2003); Knight et al., Science, 293:2269-2271 (2001); и Robertson et al., J. Biol. Chem., 243:82 (1968)). Предпочтительно, двухцепочечные РНК имеют длину по меньшей мере от 50 нуклеотидов до около 100, 200, 300, 400 или 500 нуклеотидов. Двухцепочечная РНК может иметь длину 1000, 1500, 2000, 5000 нуклеотидов или более. Данная двухцепочечная РНК может кодировать полный транскрипт гена или частичный транскрипт гена. В определенных случаях, миРНК может кодироваться плазмидой (например, транскрибироваться в виде последовательностей, которые автоматически складываются в дуплексы с петлями типа «шпилька»).

Используемый в данном документе термин «некомплементарный мотив» или «область некомплементарности» относится к части последовательности интерферирующей РНК (например, миРНК, айРНК, микроРНК), которая не имеет 100% комплементарности по отношению к ее целевой последовательности. Интерферирующая РНК может иметь по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть или более областей некомплементарности. Области некомплементарности могут быть смежными или могут быть разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более нуклеотидами. Мотивы или области некомплементарности могут содержать один нуклеотид или могут содержать два, три, четыре, пять или более нуклеотидов.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» нуклеиновой кислоты, такого как нуклеиновая кислота (например, интерферирующая РНК или микроРНК), представляет собой количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, ингибирования экспрессии целевой последовательности по сравнению с нормальным уровнем экспрессии, обнаруживаемым в отсутствие интерферирующей РНК; или микроРНК-направленная экспрессия такого количества белка, которое вызывает желаемый биологический эффект в организме, в котором экспрессируется этот белок. Ингибирование экспрессии целевого гена или целевой последовательности достигается, когда значение, полученное с интерферирующей РНК относительно контроля, составляет около 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 0%. В других вариантах осуществления экспрессированный белок представляет собой активную форму белка, который обычно экспрессируется в клетках определенного типа в организме, и терапевтически эффективное количество микроРНК представляет собой количество, которое продуцирует количество кодируемого белка,

составляющее по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%) количества белка, которое обычно экспрессируется в типе клеток здорового человека. Подходящие виды анализа для измерения экспрессии гена-мишени или последовательности-мишени включают, например, исследование уровней белка или РНК с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как дот-блоттинг, нозерн-блоттинг, гибридизация *in situ*, ИФА, иммунопреципитация, исследования ферментативной активности, а также методы фенотипирования, известные специалистам в данной области.

Под терминами «снижать», «снижение», «уменьшать» или «уменьшение» иммунного ответа посредством интерферирующей РНК подразумевается обнаруживаемое снижение иммунного ответа на данную интерферирующую РНК (например, модифицированную интерферирующую РНК). Степень снижения иммунного ответа посредством модифицированной интерферирующей РНК может быть определена относительно уровня иммунного ответа в присутствии немодифицированной интерферирующей РНК. Обнаруживаемое снижение может составлять около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более ниже, чем иммунный ответ, обнаруживаемый в присутствии немодифицированной интерферирующей РНК. Снижение иммунного ответа на интерферирующую РНК обычно измеряется снижением продукции цитокинов (например, $IFN\gamma$, $IFN\alpha$, $TNF\alpha$, IL-6 или IL-12) иммунореактивной клеткой *in vitro* или по снижению продукции цитокинов в сыворотке субъекта-млекопитающего после введения интерферирующей РНК.

Под терминами «снижать», «снижение», «уменьшать» или «уменьшение» иммунного ответа посредством микроРНК подразумевается обнаруживаемое снижение иммунного ответа на данную микроРНК (например, модифицированную микроРНК). Степень снижения иммунного ответа посредством модифицированной микроРНК может быть определена относительно уровня иммунного ответа в присутствии немодифицированной микроРНК. Обнаруживаемое снижение может составлять около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более ниже, чем иммунный ответ, обнаруживаемый в присутствии немодифицированной микроРНК. Снижение иммунного ответа на микроРНК обычно измеряется снижением продукции цитокинов (например, $IFN\gamma$, $IFN\alpha$, $TNF\alpha$, IL-6 или IL-12) иммунореактивной клеткой *in vitro* или по снижению продукции цитокинов в сыворотке субъекта-млекопитающего после введения микроРНК.

Используемый в данном документе термин «иммунореактивная клетка» относится к клетке, предпочтительно к клетке млекопитающего, которая вызывает обнаруживаемый иммунный ответ при контакте с иммуностимулирующей интерферирующей РНК, такой как немодифицированная микроРНК. Типичные иммунореактивные клетки включают, например, дендритные клетки, макрофаги, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), спленоциты и т.п. Обнаруживаемые иммунные ответы включают, например,

продукцию цитокинов или факторов роста, таких как TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF и их комбинации.

«Существенная идентичность» относится к последовательности, которая гибридизируется с эталонной последовательностью в жестких условиях или с последовательностью, которая имеет заданный процент идентичности по заданной области эталонной последовательности.

Выражение «жесткие условия гибридизации» относится к условиям, при которых нуклеиновая кислота гибридизируется со своей целевой последовательностью, обычно в сложной смеси нуклеиновых кислот, но без других последовательностей. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах. Более длинные последовательности специфически гибридизируются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Обычно жесткие условия выбираются так, чтобы они были около на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m - это температура (при определенной ионной силе, pH и концентрации нуклеиновых кислот), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизируются с последовательностью-мишенью в равновесном состоянии (поскольку последовательности-мишени присутствуют в избытке, при T_m , 50% зондов оказываются занятыми в равновесном состоянии). Жесткие условия также можно обеспечить путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для избирательной или специфической гибридизации положительный сигнал по меньшей мере в два раза превышает фон, предпочтительно в 10 раз превышает фоновую гибридизацию.

Типичные жесткие условия гибридизации могут быть следующими: 50% формамид, 5×SSC и 1% ДСН, инкубирование при 42 °С, или 5×SSC, 1% ДСН, инкубирование при 65 °С, с промывкой в 0,2×SSC и 0,1% ДСН при 65 °С. Для ПЦР температура около 36°C является типичной для амплификации в пониженных жестких условиях, хотя температуры отжига могут варьироваться от около 32°C до 48°C в зависимости от длины праймера. Для амплификации ПЦР в повышенных жестких условиях типична температура около 62 °С, хотя температуры отжига в повышенных жестких условиях могут находиться в диапазоне от около 50°C до около 65 °С, в зависимости от длины и специфичности праймера. Типичные условия цикла для амплификаций как в повышенных так и пониженных жестких условиях включают фазу денатурации при 90-95°C в течение 30 секунд-2 мин, фазу отжига продолжительностью 30 секунд-2 мин и фазу удлинения около при 72°C в течение 1-2 мин. Протоколы и руководства для реакций амплификации в повышенных и пониженных жестких условиях представлены, например, в Innis et al., *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990).

Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизируются друг с другом в жестких условиях, все же практически идентичны, если полипептиды, которые они кодируют, практически идентичны. Это происходит, например, когда копия нуклеиновой кислоты создается с использованием максимальной вырожденности кодонов, разрешенной генетическим кодом. В таких случаях нуклеиновые кислоты обычно гибридизируются в умеренно жестких условиях гибридизации. Примеры «умеренно жестких условий гибридизации» включают гибридизацию в буфере, содержащем 40% формамида, 1 М NaCl, 1% ДСН при 37 °С, и отмывку в 1×SSC при 45 °С. Положительная гибридизация по меньшей мере в два раза превышает фоновую гибридизацию. Специалисты в данной области легко поймут, что можно использовать альтернативные условия гибридизации и отмывания, чтобы обеспечить условия аналогичной жесткости. Дополнительные рекомендации по определению параметров гибридизации представлены в многочисленных ссылках, например, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds.

Термины «практически идентичный» или «существенная идентичность» в контексте двух или более нуклеиновых кислот относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов (т.е., по крайней мере, около 60%, предпочтительно, по меньшей мере около 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности в определенной области), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального осмотра. Это определение, если указано в контексте, также аналогично относится к комплементарной последовательности. Предпочтительно, существенная идентичность существует в области, которая составляет по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 нуклеотидов в длину.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

Термин «окно сравнения», используемый в данном документе, включает указание на сегмент любого из множества непрерывных положений, выбранных из группы, состоящей из от около 5 до около 60, обычно от около 10 до около 45, чаще от около 15 до около 30, в которых последовательность можно сравнивать с эталонной

последовательностью на таком же количестве непрерывных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно выполнять, например, посредством алгоритма локальной гомологии согласно Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), алгоритма гомологического выравнивания согласно Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), поиска по методу сходства согласно Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (1995 supplement)).

Предпочтительный пример алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977) и Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990), соответственно. BLAST и BLAST 2.0 используются с параметрами, описанными в данном документе, для определения процента идентичности последовательностей нуклеиновых кислот по изобретению. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin и Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5773-5787 (1993)). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность при которой совпадение двух нуклеотидных последовательностей будет происходить случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше около 0,2, более предпочтительно около 0,01 и наиболее предпочтительно меньше около 0,001.

Термин «нуклеиновая кислота», в контексте данного документа, относится к полимеру, содержащему не менее двух дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов, в одно- или двухцепочечной форме, и включает ДНК и РНК. ДНК может быть представлена в форме, например, антисмысловых молекул, плазмидной ДНК, преконденсированной ДНК, продукта ПЦР, векторов (Р1, РАС, ВАС, YAC, искусственных хромосом), экспрессионных кассет, химерных последовательностей, хромосомной ДНК или производных и комбинаций данных групп. РНК может быть в форме миРНК, асимметричной интерферирующей РНК (аиРНК), микроРНК (микроРНК), мРНК, тРНК, рРНК, тРНК, вирусной РНК (вРНК), самоамплифицирующейся РНК и их комбинаций. Нуклеиновые кислоты включают нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги

нуклеотидов или модифицированные каркасные остатки, или звенья, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе; и которые имеют сходные связывающие свойства, как и рассматриваемая нуклеиновая кислота. Примеры таких аналогов включают, без ограничений, тиофосфаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2'-О-метилрибонуклеотиды и пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК). При отсутствии специальных ограничений данный термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, обладающие свойствами связывания, аналогичными свойствам эталонных нуклеиновых кислот. Если не указано иное, то конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявно включает в себя их консервативно модифицированные варианты (например, вырожденные замещения кодонов), аллели, ортологи, ОНП (однонуклеотидный полиморфизм) и комплементарные последовательности, а также последовательность, указанную явно. Конкретно, вырожденные замещения кодонов могут достигаться путем создания последовательностей, в которых третья позиция одного или большего числа выбранных (или всех) кодонов замещена на остатки смешанного основания и/или дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). «Нуклеотиды» содержат сахар дезоксирибозу (ДНК) или рибозу (РНК), основание и фосфатную группу. Нуклеотиды соединяются друг с другом фосфатными группами. «Основания» включают пурины и пиримидины, которые дополнительно включают природные соединения аденин, тимин, гуанин, цитозин, урацил, инозин и натуральные аналоги, а также синтетические производные пуринов и пиримидинов, которые включают, без ограничений, модификации, которые приводят к появлению новых реакционноспособных групп, таких как, без ограничений, амины, спирты, тиолы, карбоксилаты и алкилгалогениды.

Термин «ген» относится к последовательности нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), которая включает часть длины или всю длину кодирующих последовательностей, необходимых для создания полипептида или полипептида-предшественника.

«Продукт гена», в контексте данного документа, относится к продукту гена, такому как РНК-транскрипт или полипептид.

Термин «липид» относится к группе органических соединений, которые включают, но не ограничиваются ими, сложные эфиры жирных кислот и характеризуются тем, что они нерастворимы в воде, но растворимы во многих органических растворителях. Их обычно делят на три класса: (1) «простые липиды», которые включают жиры и масла, а также воски; (2) «сложные липиды», которые включают фосфолипиды и гликолипиды; и (3) «производные липидов», такие как стероиды.

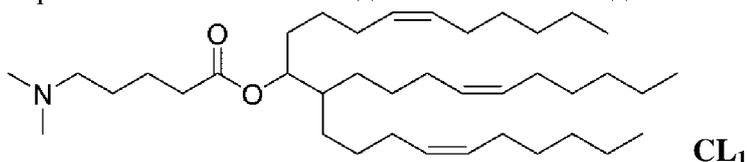
Используемый в данном документе термин «LNP» относится к частице липид-нуклеиновая кислота или частице нуклеиновая кислота-липид (например, стабильной частице нуклеиновая кислота-липид). LNP представляет собой частицу, состоящую из

липидов (например, катионного липида, некатионного липида и конъюгированного липида, который предотвращает агрегацию частицы) и нуклеиновой кислоты, причем нуклеиновая кислота (например, миРНК, айРНК, микроРНК, оцДНК, дцДНК, оцРНК, короткая шпилечная РНК (кшРНК), дцРНК, мРНК, самоамплифицирующаяся РНК или плазида, включая плазмиды, из которых транскрибируется интерферирующая РНК или мРНК) инкапсулируется внутри липида. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по меньшей мере на 50% инкапсулирована в липиде; в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по меньшей мере на 75% инкапсулирована в липиде; в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота по меньшей мере на 90% инкапсулирована в липиде; и в одном варианте осуществления нуклеиновая кислота полностью инкапсулирована в липиде. LNP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липидный конъюгат (например, конъюгат ПЭГ-липид). LNP чрезвычайно пригодны для случаев системного применения, так как они могут демонстрировать увеличенное время жизни в кровообращении после внутривенной (в/в) инъекции, они могут накапливаться в дистальных участках (например, сайтах, физически отделенных от участка введения), и они могут опосредовать экспрессию трансфицированного гена или подавление экспрессии целевого гена на этих дистальных участках.

Липидные частицы согласно изобретению (например, LNP) обычно имеют средний диаметр от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм или от около 70 до около 90 нм и по существу нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда они присутствуют в липидных частицах по данному изобретению, устойчивы в водном растворе к деградации нуклеазой. Частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида и способ их получения раскрыты, например, в публикациях патентов США №№ 20040142025 и 20070042031, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

В контексте данного документа, термин «инкапсулированный липид» может относиться к липидной частице, которая обеспечивает нуклеиновую кислоту (например, интерферирующая РНК или мРНК) с полной инкапсуляцией, частичной инкапсуляцией или обеими вариантами. В одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота, полностью инкапсулирована в липидную частицу (например, с образованием LNP или другой частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида).

Термин «катионный липид» относится к соединению формулы CL₁ или его соли:



Термин «гидрофобный липид» относится к соединениям, имеющим неполярные группы, которые включают, но не ограничиваются ими, длинноцепочечные насыщенные и

ненасыщенные алифатические углеводородные группы и такие группы, которые, необязательно, замещены одной или более ароматическими, циклоалифатическими или гетероциклическими группами. Подходящие примеры включают, но не ограничиваются ими, диацилглицерин, диалкилглицерин, N-N-диалкиламино, 1,2-диацилокси-3-аминопропан и 1,2-диалкил-3-аминопропан.

Термин «фузогенный» относится к способности липидной частицы, такой как LNP, сливаться с мембранами клетки. Мембраны могут представлять собой либо плазматическую мембрану, либо мембраны, окружающие органеллы, например эндосому, ядро и т. д.

В контексте данного документа термин «водный раствор» относится к композиции, содержащей полностью или частично воду.

В контексте данного документа термин «органический раствор липида» относится к композиции, содержащей полностью или частично органический растворитель, имеющий липид.

«Дистальный участок», в контексте данного документа, относится к физически отделенному участку, который не ограничен прилегающим капиллярным ложем, но включает участки, широко распределенные по всему организму.

«Стабильный в сыворотке» по отношению к частицам на основе нуклеиновой кислоты и липида, таким как LNP, означает, что частица не подвергается значительному разложению после воздействия анализа сывороткой или нуклеазой, который значительно разлагает свободную ДНК или РНК. Подходящие анализы включают, например, стандартный сывороточный анализ, анализ ДНКазы или анализ РНКазы.

«Системная доставка», в контексте данного документа, относится к доставке липидных частиц, которая приводит к широкому биораспределению нуклеиновой кислоты, такой как интерферирующая РНК или мРНК, в организме. Некоторые методы введения могут привести к системной доставке определенных агентов, но не других. Системная доставка означает, что пригодное, предпочтительно терапевтическое, количество агента воздействует на большинство частей тела. Для получения широкого биораспределения обычно требуется время жизни в крови, чтобы агент не быстро разлагался или не выводился (например, с помощью органов первого прохождения (печень, легкие и т. д.) или путем быстрого, неспецифического связывания клеток) до достижения участка заболевания, дистального по отношению к месту введения. Системная доставка липидных частиц может осуществляться любыми способами, известными в данной области техники, включая, например, внутривенную, подкожную и внутрибрюшинную. В предпочтительном варианте осуществления изобретения системная доставка липидных частиц осуществляется посредством внутривенной доставки.

«Местная доставка», в контексте данного документа, относится к доставке нуклеиновой кислоты, такой как интерферирующая РНК или мРНК, непосредственно в сайт-мишень в организме. Например, агент может быть доставлен местно путем прямой инъекции в место заболевания такой как опухоль или другой сайт-мишень, такой как очаг

воспаления, или орган-мишень, такой как печень, сердце, поджелудочная железа, почка и тому подобное.

Термин «млекопитающее» относится к любому виду млекопитающих такому как человек, мышь, крыса, собака, кошка, хомяк, морская свинка, кролик, домашний скот и т.п.

Термин «рак» относится к любому члену класса заболеваний, которые характеризуются неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Термин включает все известные виды рака и опухолевые состояния, независимо от того, характеризуются ли они как злокачественные, доброкачественные, мягкотканевые или солидные, а также виды рака всех стадий и степеней, включая пре- и пост-метастатический рак. Примеры различных типов рака включают, но не ограничиваются ими, рак легких, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анального канала, рак желчных протоков, рак тонкой кишки, рак желудка, рак пищевода; рак желчного пузыря, рак печени, рак поджелудочной железы, рак аппендикса, рак молочной железы, рак яичников; рак шейки матки, рак простаты, рак почек (например, почечно-клеточная карцинома), рак центральной нервной системы, глиобластома, рак кожи, лимфомы, хориокарциномы, рак головы и шеи, остеогенные саркомы и рак крови. Неограничивающие примеры конкретных типов рака печени включают гепатоцеллюлярную карциному (НСС), вторичный рак печени (например, вызванный метастазами некоторых других типов клеток, не относящихся к раку печени) и гепатобластому. Термин «опухоль», в контексте данного документа, включает одну или более раковых клеток.

Описание вариантов осуществления

В одном варианте осуществления одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты содержат мРНК.

В одном варианте осуществления одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты содержат мРНК.

В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота), которое больше около 17.

В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота), которое больше около 18.

В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота), которое больше около 19.

В одном варианте осуществления липидная наночастица имеет массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота), которое составляет от около 22 до около 25.

В одном варианте осуществления ПЭГ-С-DMA представляет собой ПЭГ2000-С-DMA.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожного введения.

В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота полностью инкапсулирована в липидной части липидной частицы, так что нуклеиновая кислота в липидной частице устойчива в водном растворе к ферментативному расщеплению, например, нуклеазой или протеазой. В определенных других вариантах осуществления липидные частицы практически нетоксичны для млекопитающих, таких как человек.

В определенных случаях нуклеиновая кислота включает молекулу интерферирующей РНК, такую как, например, миРНК, айРНК, микроРНК или их смеси. В определенных других случаях нуклеиновая кислота включает одноцепочечную или двухцепочечную ДНК, РНК или гибрид ДНК/РНК, такой как, например, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, плазида, иммуностимулирующий олигонуклеотид или их смеси. В определенных других случаях нуклеиновая кислота представляет собой одну или более молекул мРНК (например, смесь).

В одном варианте осуществления, нуклеиновая кислота содержит миРНК. В одном варианте осуществления молекула миРНК содержит двухцепочечную область длиной от около 15 до около 60 нуклеотидов (например, около 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину или 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов в длину). Молекулы миРНК по изобретению способны подавлять экспрессию целевой последовательности *in vitro* и/или *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В определенных предпочтительных вариантах осуществления молекула миРНК содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более модифицированных нуклеотидов в двухцепочечной области. В определенных случаях миРНК содержит от около 1% до около 100% (например, около 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) модифицированных нуклеотидов в двухцепочечной области. В предпочтительных вариантах осуществления менее около 25% (например, менее около 25%, 20%, 15%, 10% или 5%) или от около 1% до около 25% (например, около 1-25%, 5-25%, 10-25%, 15-25%, 20-25% или 10-20%) нуклеотидов в двухцепочечной области содержат модифицированные нуклеотиды.

В других вариантах осуществления молекула миРНК содержит модифицированные нуклеотиды, включая, но не ограничиваясь ими, 2'-О-метил(2'ОМе)нуклеотиды, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор(2'F)нуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-О-(2-метоксиэтил) (МОЕ) нуклеотиды, нуклеотиды заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA) и их смеси. В предпочтительных вариантах осуществления миРНК содержит 2'ОМенуклеотиды (например, 2'ОМепуриновые и/или пиримидиновые нуклеотиды), такие как, например, 2'ОМе-гуанозиннуклеотиды, 2'ОМе-уридиннуклеотиды, 2'ОМе-аденозиннуклеотиды, 2'ОМе-цитозиннуклеотиды и их смеси. В определенных случаях миРНК не содержит 2'ОМе-цитозиннуклеотиды. В других вариантах осуществления миРНК содержит шпилечную структуру.

миРНК может содержать модифицированные нуклеотиды в одной цепи (т.е. смысловой или антисмысловой) или в обеих цепях двухцепочечной области молекулы миРНК. Предпочтительно нуклеотиды уридина и/или гуанозина модифицированы в селективных положениях в двухцепочечной области дуплекса миРНК. Что касается модификаций уридиновых нуклеотидов, по крайней мере, один, два, три, четыре, пять, шесть или более уридиновых нуклеотидов в смысловой и/или антисмысловой цепи могут быть модифицированным уридиновым нуклеотидом, таким как 2'ОМе-уридиннуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый уридиновый нуклеотид в смысловой и/или антисмысловой цепи представляет собой 2'ОМе-уридиннуклеотид. Что касается модификаций гуанозиновых нуклеотидов, по крайней мере, один, два, три, четыре, пять, шесть или более гуанозиновых нуклеотидов в смысловой и/или антисмысловой цепи могут быть модифицированным гуанозиновым нуклеотидом, таким как 2'ОМе-гуанозиннуклеотид. В некоторых вариантах осуществления каждый гуанозиновый нуклеотид в смысловой и/или антисмысловой цепи представляет собой 2'ОМе-гуанозиннуклеотид.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более мотивов 5'-GU-3' в последовательности миРНК могут быть модифицированы, например, путем введения ошибок спаривания нуклеотидов для устранения мотивов 5'-GU-3' и/или путем введения модифицированных нуклеотидов, таких как 2'ОМе-нуклеотиды. Мотив 5'-GU-3' может находиться в смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях последовательности миРНК. Мотивы 5'-GU-3' могут быть смежными друг с другом или, в качестве альтернативы, они могут быть разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более нуклеотидами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления модифицированная молекула миРНК является менее иммуностимулирующей, чем соответствующая немодифицированная последовательность миРНК. В таких вариантах осуществления модифицированная молекула миРНК с сниженными иммуностимулирующими свойствами преимущественно сохраняет активность РНКи против целевой последовательности. В другом варианте осуществления иммуностимулирующие свойства модифицированной молекулы миРНК и ее способность подавлять экспрессию целевого гена могут быть сбалансированы или оптимизированы путем введения минимальных и селективных 2'ОМе-модификаций в последовательность миРНК, такую как, например, в двухцепочечной области дуплекса миРНК. В определенных случаях модифицированная миРНК по крайней мере около на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% имеет сниженный иммуностимулирующий эффект, чем соответствующая немодифицированная миРНК. Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что иммуностимулирующие свойства модифицированной молекулы миРНК и соответствующей немодифицированной молекулы миРНК могут быть определены, например, путем измерения уровней INF- α и/или IL-6 от около двух до около двенадцати

часов после системного введения млекопитающему или трансфекции иммунореактивной клетки млекопитающего с использованием подходящей системы доставки на основе липидов (например, как раскрытая в данном документе система доставки LNP).

В определенных вариантах осуществления модифицированная молекула миРНК имеет IC_{50} (т. е. концентрацию полумаксимального ингибирования), меньшую или равную десятикратному значению соответствующей немодифицированной миРНК (т. е. модифицированная миРНК имеет IC_{50} , которая меньше или равна десятикратному значению IC_{50} соответствующей немодифицированной миРНК). В других вариантах осуществления модифицированная миРНК имеет IC_{50} , меньше или равно трехкратному значению соответствующей немодифицированной последовательности миРНК. В еще других вариантах осуществления модифицированная миРНК имеет IC_{50} , меньше или равно двукратному значению соответствующей немодифицированной миРНК. Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что может быть построена кривая доза-ответ, а значения IC_{50} для модифицированной миРНК и соответствующей немодифицированной миРНК могут быть легко определены с использованием способов, известных специалистам в данной области техники.

В еще одном варианте осуществления модифицированная молекула миРНК способна подавлять экспрессию целевой последовательности по меньшей мере около на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% относительно соответствующей немодифицированной последовательности миРНК.

В некоторых вариантах осуществления молекула миРНК не содержит модификаций фосфатного остова, например, в смысловой и/или антисмысловой цепи двухцепочечной области. В других вариантах осуществления миРНК содержит одну, две, три, четыре или более модификаций фосфатного остова, например, в смысловой и/или антисмысловой цепи двухцепочечной области. В предпочтительных вариантах осуществления миРНК не содержит модификаций фосфатного остова.

В дополнительных вариантах осуществления миРНК не содержит 2'-дезоксинуклеотидов, например, в смысловой и/или антисмысловой цепи двухцепочечной области. В еще дополнительных вариантах осуществления миРНК содержит один, два, три, четыре или более 2'-дезоксинуклеотидов, например, в смысловой и/или антисмысловой цепи двухцепочечной области. В предпочтительных вариантах осуществления миРНК не содержит 2'-дезоксинуклеотидов.

В определенных случаях нуклеотид на 3'-конце двухцепочечной области смысловой и/или антисмысловой цепи не является модифицированным нуклеотидом. В определенных других случаях нуклеотиды около 3'-конца (например, в пределах одного, двух, трех или четырех нуклеотидов на 3'-конце) двухцепочечной области смысловой и/или антисмысловой цепи не являются модифицированными нуклеотидами.

Описанные в данном документе молекулы миРНК могут иметь 3'-выступы из одного, двух, трех, четырех или более нуклеотидов на одной или обеих сторонах

двухцепочечной области или могут не иметь выступов (т. е. иметь тупые концы) с одной или обеих сторон двухцепочечной области. Предпочтительно миРНК имеет 3'-выступы из двух нуклеотидов на каждой стороне двухцепочечной области. В определенных случаях 3'-выступ на антисмысловой цепи комплементарен целевой последовательности, а 3'-выступ на смысловой цепи комплементарен комплементарной цепи целевой последовательности. В качестве альтернативы, 3'-выступы не комплементарны целевой последовательности или ее комплементарной цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступы содержат один, два, три, четыре или более нуклеотидов, таких как 2'-дезоксид(2'Н)нуклеотиды. В определенных предпочтительных вариантах осуществления 3'-выступы содержат дезокситимидин (dT) и/или уридиннуклеотиды. В других вариантах осуществления один или более нуклеотидов в 3'-выступах на одной или обеих сторонах двухцепочечной области содержат модифицированные нуклеотиды. Неограничивающие примеры модифицированных нуклеотидов описаны выше и включают 2'ОМе-нуклеотиды, 2'-дезоксид-2'F-нуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-О-2-МОЕ-нуклеотиды, нуклеотиды LNA и их смеси. В предпочтительных вариантах осуществления один, два, три, четыре или более нуклеотидов в 3'-выступах, присутствующих на смысловой и/или антисмысловой цепи миРНК, содержат 2'ОМе-нуклеотиды (например, пуриновые и/или пиримидиновые 2'ОМе-нуклеотиды) такие как, например, 2'ОМе-гуанозиннуклеотиды, 2'ОМе-уридиннуклеотиды, 2'ОМе-аденозиннуклеотиды, 2'ОМе-цитозиннуклеотиды и их смеси.

миРНК может содержать по меньшей мере одну или смесь (например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) немодифицированных и/или модифицированных последовательностей миРНК, которые подавляют экспрессию целевого гена. Смесь миРНК может содержать последовательности, которые направлены на одну и ту же область или домен (например, «горячую точку») и/или разные области или домены одного или нескольких генов-мишеней. В определенных случаях одна или более (например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) модифицированных миРНК, которые подавляют экспрессию целевого гена, присутствуют в смеси. В определенных других случаях одна или более (например, по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) немодифицированных последовательностей миРНК, которые подавляют экспрессию целевого гена, присутствуют в смеси.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит или состоит из последовательности, которая по меньшей мере около на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% комплементарна целевой последовательности или ее части. В других вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит или состоит из последовательности, которая на 100% комплементарна целевой последовательности или ее части. В дополнительных вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы миРНК содержит или состоит из последовательности, которая специфически гибридизируется с целевой последовательностью или ее частью.

В дополнительных вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит или состоит из последовательности, которая по меньшей мере около на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична целевой последовательности или ее части. В дополнительных вариантах осуществления смысловая цепь молекулы миРНК содержит или состоит из последовательности, которая на 100% идентична целевой последовательности или ее части.

Примеры производных холестерина включают, но не ограничиваются ими, холестанол, холестанон, холестенон, копростанол, холестерил-2'-гидроксиэтиловый эфир, холестерил-4'-гидроксibuтиловый эфир и их смеси. В данном документе описан синтез холестерил-2'-гидроксиэтилового эфира.

Как используется в данном документе, DSPC означает дистеароилфосфатидилхолин.

В липидных частицах по изобретению нуклеиновая кислота может быть полностью инкапсулирована внутри липидной частицы, тем самым защищая нуклеиновую кислоту от ферментативного разложения. В предпочтительных вариантах осуществления LNP, содержащая нуклеиновую кислоту, такую как интерферирующая РНК (например, миРНК) или мРНК, полностью инкапсулирована в липидной частице, тем самым защищая нуклеиновую кислоту от расщепления нуклеазой. В определенных случаях нуклеиновая кислота в LNP практически не разлагается после воздействия на частицу нуклеазой при температуре 37°C в течение по меньшей мере около 20, 30, 45 или 60 минут. В определенных других случаях нуклеиновая кислота в LNP практически не разлагается после инкубации частицы в сыворотке при температуре 37°C в течение по меньшей мере около 30, 45 или 60 минут или по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36 часов. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота (например, нуклеиновая кислота, такая как миРНК или мРНК) образует комплекс с липидной частью частицы. Одно из преимуществ композиций по данному изобретению состоит в том, что композиции липидных частиц практически нетоксичны для млекопитающих, таких как человек.

Термин «полностью инкапсулирован» указывает на то, что нуклеиновая кислота в липидной частице не подвергается значительному разложению после воздействия сыворотки или нуклеазы или протеазы, которые могли бы значительно разложить свободную ДНК, РНК или белок. В полностью инкапсулированной системе предпочтительно менее чем около 25% нуклеиновой кислоты в частице разлагается при лечении, при котором обычно разлагается 100% свободной нуклеиновой кислоты, более предпочтительно менее чем около 10%, и наиболее предпочтительно менее чем около 5% нуклеиновой кислоты разлагается в частице. В контексте терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот полную инкапсуляцию можно определить с помощью анализа Oligreen®. Oligreen® - это ультрачувствительный флуоресцентный краситель нуклеиновой кислоты для количественного определения олигонуклеотидов и одноцепочечной ДНК или РНК в растворе (доступный от Invitrogen Corporation; Карлсбад,

Калифорния). «Полностью инкапсулирован» также указывает на то, что липидные частицы стабильны в сыворотке крови, то есть они быстро не разлагаются на свои составные части при введении *in vivo*.

В другом аспекте данного изобретения предложена композиция липидных частиц (например, LNP), содержащая множество липидных частиц. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеиновая кислота (например, нуклеиновая кислота) полностью инкапсулированы в липидной части липидных частиц (например, LNP), так что от около 30% до около 100%, от около 40% до около 100%, от около 50% до около 100%, от около 60% до около 100%, от около 70% до около 100%, от около 80% до около 100%, от около 90% до около 100%, от около 30% до около 95%, от около 40% до около 95%, от около 50% до около 95%, от около 60% до около 95%, от около 70% до около 95%, от около 80% до около 95%, от около 85% до около 95%, от около 90% до около 95%, от около 30% до около 90%, от около 40% до около 90%, от около 50% до около 90%, от около 60% до около 90%, от около 70% до около 90%, от около 80% до около 90% или по меньшей мере около 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% (или любую его долю или диапазон) липидных частиц (например, LNP) содержат инкапсулированный активный агент или терапевтическое средство.

Обычно липидные частицы (например, LNP) по изобретению имеют соотношение липид:активный агент (например, липид:нуклеиновая кислота) (соотношение масса/масса) от около 1 до около 100. В некоторых случаях соотношение липид:активный агент (например, липид:нуклеиновая кислота) (соотношение масса/масса) находится в диапазоне от около 1 до около 50, от около 2 до около 25, от около 3 до около 20, от около 4 до около 15 или от около 5 до около 10.

Обычно липидные частицы (например, LNP) по изобретению имеют средний диаметр от около 40 нм до около 150 нм. В предпочтительных вариантах осуществления липидные частицы (например, LNP) по изобретению имеют средний диаметр от около 40 нм до около 130 нм, от около 40 нм до около 120 нм, от около 40 нм до около 100 нм, от около 50 нм до около 120 нм, от около 50 нм до около 100 нм, от около 60 нм до около 120 нм, от около 60 нм до около 110 нм, от около 60 нм до около 100 нм, от около 60 нм до около 90 нм, от около 60 нм до около 80 нм, от около 70 нм до около 120 нм, от около 70 нм до около 110 нм, от около 70 нм до около 100 нм, от около 70 нм до около 90 нм, от около 70 нм до около 80 нм или менее чем около 120 нм, 110 нм, 100 нм, 90 нм или 80 нм (или любую его долю или диапазон).

В данном изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая липидные частицы (например, LNP), описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте данного изобретения предложен способ введения одного или более активных агентов или терапевтических средств (например, нуклеиновой кислоты) в клетку, включающий контактирование клетки с липидной частицей (например,

LNP), описанной в данном документе. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего, такого как человек. В другом варианте осуществления данного изобретения предложен способ доставки *in vivo* одного или более активных агентов или терапевтических средств (например, нуклеиновой кислоты), включающий введение субъекту-млекопитающему липидной частицы (например, LNP), описанной в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления способ введения включает, но не ограничивается ими, пероральный, интраназальный, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, внутрисуставной, внутриочаговый, интратрахеальный, подкожный и внутрикожный. Предпочтительно, чтобы субъект-млекопитающее был человеком.

В одном варианте по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20% или 25% от общей введенной дозы липидных частиц (например, LNP) присутствует в плазме около 8, 12, 24, 36 или 48 часов после инъекции. В другом варианте более чем около 20%, 30%, 40%, 60%, 70% или 80% от общей введенной дозы липидных частиц (например, LNP) присутствует в плазме около 8, 12, 24, 36 или 48 часов после инъекции. В определенных случаях более чем около 10% совокупности частиц присутствует в плазме млекопитающего примерно через 1 час после введения. В определенных других случаях присутствие липидных частиц (например, LNP) можно обнаружить по меньшей мере примерно через 1 час после введения частицы. В определенных вариантах осуществления присутствие нуклеиновой кислоты, такой как интерферирующая РНК (например, миРНК) или мРНК, выявляется в клетках примерно через 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 или 96 часов после введения (например, в легкие, печень, опухоль или очаг воспаления). В других вариантах осуществления подавление экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислотой, такой как интерферирующая РНК (например, миРНК) выявляется примерно через 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 или 96 часов после введения. В еще других вариантах осуществления подавление экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислотой, такой как интерферирующая РНК (например, миРНК), происходит предпочтительно в опухолевых клетках или в клетках в месте воспаления. В дополнительных вариантах осуществления присутствие или эффект нуклеиновой кислоты, такой как интерферирующая РНК (например, миРНК), в клетках на участке, проксимальном или удаленном от места введения, или в клетках легкого, печени или опухоли обнаруживается примерно через 12, 24, 48, 72 или 96 часов или примерно через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 или 28 дней после введения. В других вариантах осуществления повышающая регуляция экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислоты, такой как мРНК или самоамплифицирующаяся РНК, выявляется примерно через 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 или 96 часов после введения. В еще других вариантах осуществления повышающая регуляция экспрессии целевой последовательности нуклеиновой кислоты, такой как мРНК или самоамплифицирующаяся РНК, происходит предпочтительно в опухолевых клетках или в клетках в месте воспаления. В дополнительных вариантах осуществления присутствие или эффект нуклеиновой кислоты, такой как мРНК или самоамплифицирующаяся РНК, в

клетках на участке, проксимальном или удаленном от места введения, или в клетках легкого, печени или опухоли обнаруживается примерно через 12, 24, 48, 72 или 96 часов или примерно через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 или 28 дней после введения. В дополнительных вариантах осуществления липидные частицы (например, LNP) по изобретению вводят парентерально или внутривнутрибрюшинно. В вариантах осуществления липидные частицы (например, LNP) по изобретению вводят внутримышечно.

В некоторых вариантах осуществления липидные частицы (например, LNP) по изобретению полезны в способах терапевтической доставки одной или более нуклеиновых кислот, содержащих последовательность интерферирующей РНК (например, миРНК). В частности, одной целью данного изобретения является предоставление способов *in vitro* и *in vivo* для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего (например, грызуна, такого как мышь или примат, такой как человек, шимпанзе или обезьяна) путем подавления или отключения транскрипции и/или трансляции одной или более представляющих интерес целевых последовательностей нуклеиновых кислот или генов. В качестве неограничивающего примера способы по изобретению применимы для доставки *in vivo* интерферирующей РНК (например, миРНК) в печень и/или опухоль субъекта-млекопитающего. В определенных вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с экспрессией и/или сверхэкспрессией гена, и экспрессия или сверхэкспрессия гена снижается под действием интерферирующей РНК (например, миРНК). В определенных других вариантах осуществления млекопитающему можно вводить терапевтически эффективное количество липидных частиц (например, LNP). В некоторых случаях интерферирующая РНК (например, миРНК) входит в состав LNP, и частицы вводятся пациентам, нуждающимся в таком лечении. В других случаях клетки извлекают из пациента, интерферирующая РНК (например, миРНК) доставляется *in vitro* (например, с использованием LNP, описанной в данном документе), и клетки повторно вводятся пациенту.

В дополнительном аспекте данного изобретения предложены липидные частицы (например, LNP), содержащие молекулы асимметричной интерферирующей РНК (аиРНК), которые подавляют экспрессию целевого гена, и способы использования таких частиц для подавления экспрессии целевого гена.

В одном варианте осуществления молекула аиРНК содержит двухцепочечную (дуплексную) область длиной от около 10 до около 25 (спаренных оснований) нуклеотидов, при этом молекула аиРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую 5'- и 3'-выступы, и причем молекула аиРНК способна подавлять экспрессию целевого гена.

В определенных случаях молекула аиРНК содержит двухцепочечную (дуплексную) область длиной около 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 или 14-17 (спаренных оснований) нуклеотидов, чаще всего 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 (спаренных оснований) нуклеотидов в длину. В определенных других случаях 5'- и 3'-выступы на антисмысловой цепи содержат последовательности, которые комплементарны последовательности РНК-мишени, и могут дополнительно содержать нецелевые последовательности. В некоторых

вариантах осуществления каждый из 5'- и 3'-выступов на антисмысловой цепи содержит или состоит из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи или более нуклеотидов.

В других вариантах осуществления молекула айРНК содержит модифицированные нуклеотиды, выбранные из группы, состоящей из 2'ОМе-нуклеотидов, 2'F-нуклеотидов, 2'-дезоксинуклеотидов, 2'-О-МОЕ-нуклеотидов, нуклеотидов LNA и их смесей. В предпочтительном варианте осуществления молекула айРНК содержит 2'ОМе-нуклеотиды. В качестве неограничивающего примера 2'ОМе-нуклеотиды могут быть выбраны из группы, состоящей из 2'ОМе-гуанозиннуклеотидов, 2'ОМе-уридиннуклеотидов и их смесей.

В родственном аспекте данного изобретения предложены липидные частицы (например, LNP), содержащие молекулы микроРНК (микроРНК), которые подавляют экспрессию целевого гена, а также способы использования таких частиц для подавления экспрессии целевого гена.

В одном варианте осуществления молекула микроРНК содержит от около 15 до около 60 нуклеотидов в длину, причем молекула микроРНК способна подавлять экспрессию целевого гена.

В определенных случаях молекула микроРНК содержит около 15-50, 15-40 или 15-30 нуклеотидов в длину, более типично около 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину и предпочтительно около 20-24, 21-22 или 21-23 нуклеотидов в длину. В предпочтительном варианте осуществления молекула микроРНК представляет собой зрелую молекулу микроРНК, нацеленную на интересующую последовательность РНК.

В других вариантах осуществления молекула микроРНК содержит модифицированные нуклеотиды, выбранные из группы, состоящей из 2'ОМе-нуклеотидов, 2'F-нуклеотидов, 2'-дезоксинуклеотидов, 2'-О-МОЕ-нуклеотидов, нуклеотидов LNA и их смесей. В предпочтительном варианте осуществления молекула микроРНК содержит 2'ОМе-нуклеотиды. В качестве неограничивающего примера 2'ОМе-нуклеотиды могут быть выбраны из группы, состоящей из 2'ОМе-гуанозиннуклеотидов, 2'ОМе-уридиннуклеотидов и их смесей.

В некоторых вариантах осуществления липидные частицы (например, LNP) по изобретению полезны в способах терапевтической доставки одной или более молекул мРНК. В частности, одной целью данного изобретения является предоставление способов *in vitro* и *in vivo* для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего (например, грызуна, такого как мышь, или примат, такой как человек, шимпанзе или обезьяна) посредством экспрессии одного или более белков-мишеней. В качестве неограничивающего примера способы по изобретению применимы для доставки *in vivo* одной или более молекул мРНК субъекту-млекопитающему. В определенных других вариантах осуществления млекопитающему можно вводить терапевтически эффективное количество липидных частиц (например, LNP). В некоторых случаях одна или более молекул мРНК входят в состав LNP, и частицы вводятся пациентам, нуждающимся в таком лечении. В других случаях клетки извлекают из пациента, одна или более молекул

мРНК доставляется *in vitro* (например, с использованием LNP, описанной в данном документе), и клетки повторно вводятся пациенту.

В других вариантах осуществления молекула мРНК содержит модифицированные нуклеотиды, выбранные из группы, состоящей из 2'ОМе-нуклеотидов, 2'F-нуклеотидов, 2'-дезоксинуклеотидов, 2'-О-МОЕ-нуклеотидов, нуклеотидов LNA и их смесей. В родственном аспекте данного изобретения предложены липидные частицы (например, LNP), содержащие молекулы микроРНК (микроРНК), которые подавляют экспрессию целевого гена, а также способы использования таких частиц для подавления экспрессии целевого гена.

Как таковые, липидные частицы по изобретению (например, LNP) являются выгодными и подходят для использования при введении активных агентов или терапевтических средств, таких как нуклеиновая кислота (например, интерферирующая РНК, такая как миРНК, айРНК и/или микроРНК; или мРНК) субъекту (например, млекопитающему, такому как человек), поскольку они стабильны в циркуляции, имеют размер, необходимый для фармакодинамического поведения для доступа к внесосудистым участкам, и способны достигать популяции клеток-мишеней.

В контексте данного изобретения термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» относятся к полимеру или олигомеру нуклеотида, или к мономерам нуклеозидов, состоящему из встречающихся в природе оснований, сахаров и межсахарных (каркасных) звеньев. Термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» также включают полимеры или олигомеры, содержащие не встречающиеся в природе мономеры или их фрагменты, которые действуют аналогичным образом. Такие модифицированные или замещенные олигонуклеотиды зачастую являются предпочтительными в сравнении с натуральными формами благодаря своим свойствам, таким как, например, усиленный клеточный захват, пониженная иммуногенность и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

Олигонуклеотиды обычно классифицируются как дезоксирибоолигонуклеотиды или рибоолигонуклеотиды. Дезоксирибонуклеотид состоит из пятиатомного сахара, называемого дезоксирибозой, ковалентно соединенного с фосфатом у атомов углерода 5' и 3' данного сахара, с образованием чередующегося неразветвленного полимера. Рибоолигонуклеотид состоит из сходной повторяющейся структуры, где пятиатомный сахар представляет собой рибозу.

Нуклеиновая кислота, которая присутствует в частице на основе липида и нуклеиновой кислоты по данному изобретению, включает любую известную форму нуклеиновой кислоты. Используемые в данном документе нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечной ДНК или РНК, или двухцепочечной ДНК или РНК, или гибридами ДНК-РНК. Примеры двухцепочечной ДНК описаны в данном документе и включают, например, структурные гены, гены, включая контрольные участки и участки терминции, и самореплицирующиеся системы, такие как вирусная или плазмидная ДНК. Примеры двухцепочечной РНК описаны в данном документе и включают, например, миРНК и другие агенты РНКи, такие как айРНК и пре-миРНК. Одноцепочечные нуклеиновые

кислоты включают, например, антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы, зрелую микроРНК и олигонуклеотиды, образующие триплекс.

Нуклеиновые кислоты могут иметь различную длину, обычно в зависимости от конкретной формы нуклеиновой кислоты. Например, в конкретных вариантах осуществления плазмиды или гены могут иметь длину от около 1000 до около 100 000 нуклеотидных остатков. В конкретных вариантах осуществления олигонуклеотиды могут иметь длину от около 10 до около 100 нуклеотидов. В различных связанных вариантах осуществления олигонуклеотиды, как одноцепочечные, так и двухцепочечные, и трехцепочечные, могут иметь длину от около 10 до около 60 нуклеотидов, от около 15 до около 60 нуклеотидов, от около 20 до около 50 нуклеотидов, от около 15 до около 30 нуклеотидов или от около 20 до около 30 нуклеотидов в длину.

В конкретных вариантах осуществления олигонуклеотид (или его цепь) по изобретению специфически гибридизируется с полинуклеотидной последовательностью-мишенью или комплементарен ей. Используемые в данном документе термины «специфически гибридизируемый» и «комплементарный» указывают на достаточную степень комплементарности, так что между ДНК или РНК-мишенью и олигонуклеотидом происходит стабильное и специфическое связывание. Понятно, что олигонуклеотид не обязательно должен быть на 100% комплементарным своей последовательности нуклеиновой кислоты-мишени для специфической гибридизации. В предпочтительных вариантах осуществления олигонуклеотид является специфически гибридизуемым, когда связывание олигонуклеотида с целевой последовательностью мешает нормальной функции целевой последовательности, вызывая потерю ее полезности или экспрессии, и существует достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигонуклеотида с последовательностями, не являющимися мишенями, в условиях, при которых желательно специфическое связывание, т.е. в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* или терапевтического лечения, или, в случае анализов *in vitro*, в условиях, в которых проводятся анализы. Таким образом, олигонуклеотид может содержать 1, 2, 3 или более замен оснований по сравнению с областью гена или последовательности мРНК, на которую он нацелен или с которой он специфически гибридизируется.

миРНК

миРНК как компонент частиц на основе нуклеиновой кислоты и липида по данному изобретению способна подавлять экспрессию интересующего целевого гена. Каждая цепь дуплекса миРНК обычно имеет длину от около 15 до около 60 нуклеотидов, предпочтительно от около 15 до около 30 нуклеотидов в длину. В определенных вариантах осуществления миРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Модифицированная миРНК обычно является менее иммуностимулирующей, чем соответствующая немодифицированная последовательность миРНК, и сохраняет активность РНКи против интересующего гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления модифицированная миРНК содержит по меньшей мере один пуриновый

или пиримидиновый 2'ОМе-нуклеотид, такой как 2'ОМе-гуанозин, 2'ОМе-уридин, 2'ОМе-аденозин и/или 2'ОМе-цитозиннуклеотид. В предпочтительных вариантах осуществления один или более нуклеотидов уридина и/или гуанозина модифицированы. Модифицированные нуклеотиды могут присутствовать в одной цепи (т.е. смысловой или антисмысловой) или в обеих цепях миРНК. Последовательности миРНК могут иметь выступы (например, 3'- или 5'-выступы, как описано в Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188 (2001) или Nykänen et al., *Cell*, 107:309 (2001)) или могут не иметь выступов (т. е. иметь тупые концы).

Модифицированная миРНК обычно составляет от около 1% до около 100% (например, около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%) модифицированных нуклеотидов в двухцепочечной области дуплекса миРНК. В определенных вариантах осуществления один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более нуклеотидов в двухцепочечной области миРНК содержат модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления менее около 25% (например, менее около 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) нуклеотидов в двухцепочечной области миРНК содержат модифицированные нуклеотиды.

В других вариантах осуществления от около 1% до около 25% (например, от около 1%-25%, 2%-25%, 3%-25%, 4%-25%, 5%-25%, 6%-25%, 7%-25%, 8%-25%, 9%-25%, 10%-25%, 11%-25%, 12%-25%, 13%-25%, 14%-25%, 15%-25%, 16%-25%, 17%-25%, 18%-25%, 19%-25%, 20%-25%, 21%-25%, 22%-25%, 23%-25%, 24%-25% и т.д.) или от около 1% до около 20% (например, от около 1%-20%, 2%-20%, 3%-20%, 4%-20%, 5%-20%, 6%-20%, 7%-20%, 8%-20%, 9%-20%, 10%-20%, 11%-20%, 12%-20%, 13%-20%, 14%-20%, 15%-20%, 16%-20%, 17%-20%, 18%-20%, 19%-20%, 1%-19%, 2%-19%, 3%-19%, 4%-19%, 5%-19%, 6%-19%, 7%-19%, 8%-19%, 9%-19%, 10%-19%, 11%-19%, 12%-19%, 13%-19%, 14%-19%, 15%-19%, 16%-19%, 17%-19%, 18%-19%, 1%-18%, 2%-18%, 3%-18%, 4%-18%, 5%-18%, 6%-18%, 7%-18%, 8%-18%, 9%-18%, 10%-18%, 11%-18%, 12%-18%, 13%-18%, 14%-18%, 15%-18%, 16%-18%, 17%-18%, 1%-17%, 2%-17%, 3%-17%, 4%-17%, 5%-17%, 6%-17%, 7%-17%, 8%-17%, 9%-17%, 10%-17%, 11%-17%, 12%-17%, 13%-17%, 14%-17%, 15%-17%, 16%-17%, 1%-16%, 2%-16%, 3%-16%, 4%-16%, 5%-16%, 6%-16%, 7%-16%, 8%-16%, 9%-16%, 10%-16%, 11%-16%, 12%-16%, 13%-16%, 14%-16%, 15%-16%, 1%-15%, 2%-15%, 3%-15%, 4%-15%, 5%-15%, 6%-15%, 7%-15%, 8%-15%, 9%-15%, 10%-15%, 11%-15%, 12%-15%, 13%-15%, 14%-15% и т.д.) нуклеотидов в двухцепочечной области миРНК содержат модифицированные нуклеотиды.

В дополнительных вариантах осуществления, например, когда одна или обе цепи миРНК селективно модифицированы по нуклеотидам уридина и/или гуанозина, полученная модифицированная миРНК может содержать менее около 30%

модифицированных нуклеотидов (например, менее около 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% модифицированных нуклеотидов) или от около 1% до около 30% модифицированных нуклеотидов (например, от около 1%-30%, 2%-30%, 3%-30%, 4%-30%, 5%-30%, 6%-30%, 7%-30%, 8%-30%, 9%-30%, 10%-30%, 11%-30%, 12%-30%, 13%-30%, 14%-30%, 15%-30%, 16%-30%, 17%-30%, 18%-30%, 19%-30%, 20%-30%, 21%-30%, 22%-30%, 23%-30%, 24%-30%, 25%-30%, 26%-30%, 27%-30%, 28%-30% или 29%-30% модифицированных нуклеотидов).

Выбор последовательностей миРНК

Подходящие последовательности миРНК можно идентифицировать любыми способами, известными в данной области техники. Обычно способы, описанные в Elbashir et al., *Nature*, 411:494-498 (2001) и Elbashir et al., *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001) сочетаются с правилами направленной модификации, изложенными в Reynolds et al., *Nature Biotech.*, 22(3):326-330 (2004).

Обычно 3' нуклеотидная последовательность стартового кодона AUG транскрипта из интересующего гена-мишени сканируется на предмет динуклеотидных последовательностей (например, AA, NA, CC, GG или UU, где N=C, G или U) (см., например, Elbashir et al., *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001)). Нуклеотиды, расположенные непосредственно около 3' динуклеотидных последовательностей, идентифицируют как потенциальные последовательности миРНК (т.е. последовательность-мишень или последовательность смысловой цепи). Обычно 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35 или более нуклеотидов, непосредственно около 3' динуклеотидных последовательностей, идентифицируются как потенциальные последовательности миРНК. В некоторых вариантах осуществления динуклеотидная последовательность представляет собой последовательность AA или NA, и 19 нуклеотидов, непосредственно около 3' динуклеотида AA или NA, идентифицируются как потенциальные последовательности миРНК. Последовательности миРНК обычно расположены в разных положениях по длине гена-мишени. Для дальнейшего повышения эффективности подавления экспрессии последовательностей миРНК, потенциальные последовательности миРНК могут быть проанализированы для идентификации сайтов, которые не содержат областей гомологии с другими кодирующими последовательностями, например, в клетке-мишени или организме. Например, подходящая последовательность миРНК около из 21 пары оснований обычно не будет иметь более чем 16-17 смежных пар оснований гомологии с кодирующими последовательностями в клетке или организме-мишени. Если последовательности миРНК должны экспрессироваться с промотора РНК Pol III, выбирают последовательности миРНК, не содержащие более 4 смежных А или Т.

После идентификации потенциальной последовательности миРНК может быть сконструирована комплементарная последовательность (т.е. последовательность антисмысловой цепи). Потенциальная последовательность миРНК также может быть проанализирована с использованием множества критериев, известных в данной области

техники. Например, для повышения эффективности подавления экспрессии последовательности миРНК могут быть проанализированы с помощью алгоритма направленной модификации для идентификации последовательностей, которые имеют одну или более из следующих характеристик: (1) содержание G/C от около 25% до около 60% G/C; (2) по меньшей мере 3 A/U в 15-19 положениях смысловой цепи; (3) отсутствие внутренних повторов; (4) A в 19 положении смысловой цепи; (5) A в 3 положении смысловой цепи; (6) U в 10 положении смысловой цепи; (7) отсутствие G/C в 19 положении смысловой цепи; и (8) отсутствие G в 13 положении смысловой цепи. Инструменты конструирования миРНК, которые включают алгоритмы, которые присваивают подходящие значения для каждой из этих характеристик и полезны для выбора миРНК, можно найти, например, по адресу: <http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>. Специалист в данной области поймет, что последовательности с одной или более из вышеперечисленных характеристик могут быть выбраны для дальнейшего анализа и тестирования в качестве потенциальных последовательностей миРНК

Кроме того, потенциальные последовательности миРНК с одним или более из следующих критериев часто могут быть исключены как миРНК: (1) последовательности, содержащие участок из 4 или более одного и того же основания в ряду; (2) последовательности, содержащие гомополимеры Gs (т.е. для уменьшения возможных неспецифических эффектов из-за структурных характеристик этих полимеров; (3) последовательности, содержащие мотивы из трех оснований (например, GGG, CCC, AAA или TTT); (4) последовательности, содержащие отрезки из 7 или более G/C подряд, и (5) последовательности, содержащие прямые повторы 4 или более оснований в кандидатах, приводящие к внутренним складчатым структурам. Однако специалист в данной области поймет, что последовательности с одной или более из вышеперечисленных характеристик все же могут быть выбраны для дальнейшего анализа и тестирования в качестве потенциальных последовательностей миРНК

В некоторых вариантах осуществления потенциальные последовательности миРНК могут быть дополнительно проанализированы на основе асимметрии дуплекса миРНК, как описано, например, в Khvorova et al., *Cell*, 115:209-216 (2003) и Schwarz et al., *Cell*, 115:199-208 (2003). В других вариантах осуществления потенциальные последовательности миРНК могут быть дополнительно проанализированы на основе вторичной структуры в целевом сайте, как описано, например, в Luo et al., *Biophys. Res. Commun.*, 318:303-310 (2004). Например, вторичная структура в целевом сайте может быть смоделирована с использованием алгоритма Mfold (доступного по адресу <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) для выбора последовательностей миРНК, которые обеспечивают доступность в сайт-мишень с меньшим количеством вторичной структуры в виде спаривания оснований и структур типа «петля-на-стебле».

Как только потенциальная последовательность миРНК была идентифицирована, последовательность может быть проанализирована на наличие любых

иммуностимулирующих свойств, например, с использованием анализа цитокинов *in vitro* или модели на животных *in vivo*. Мотивы в смысловой и/или антисмысловой цепи последовательности миРНК, такие как мотивы, богатые на GU (например, 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3' и т.д.) также могут указывать на то, может ли последовательность быть иммуностимулирующей. Как только будет обнаружено, что молекула миРНК является иммуностимулирующей, она может быть модифицирована для уменьшения ее иммуностимулирующих свойств, как описано в данном документе. В качестве неограничивающего примера последовательность миРНК может контактировать с иммунореактивной клеткой млекопитающего в таких условиях, что клетка вырабатывает вызывает обнаруживаемый иммунный ответ, чтобы определить, является ли миРНК иммуностимулирующей или неиммуностимулирующей миРНК. Иммунореактивная клетка млекопитающего может происходить от млекопитающего, не подвергавшегося воздействию (т.е. млекопитающего, которое ранее не контактировало с генным продуктом последовательности миРНК). Иммунореактивной клеткой млекопитающего может быть, например, мононуклеарная клетка периферической крови (МКПК), макрофаг и т.п. Обнаруживаемый иммунный ответ может включать продукцию цитокина или фактора роста, такого как, например, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12 или их комбинацию. Молекула миРНК, идентифицированная как иммуностимулирующая, затем может быть модифицирована для уменьшения ее иммуностимулирующих свойств путем замены по крайней мере одного из нуклеотидов смысловой и/или антисмысловой цепи модифицированными нуклеотидами. Например, менее около 30% (например, менее около 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%) нуклеотидов в двухцепочечной области дуплекса миРНК можно заменить на модифицированные нуклеотиды, такие как 2'ОМе-нуклеотиды. Затем модифицированная миРНК может контактировать с иммунореактивной клеткой млекопитающего, как описано выше, для подтверждения того, что ее иммуностимулирующие свойства были уменьшены или подавлены.

Подходящие анализы *in vitro* для обнаружения иммунного ответа включают, но не ограничиваются ими, сэндвич-иммуноанализ с двойными моноклональными антителами, разработанный David et al. (Патент США №. 4376110); сэндвич-анализ с моноклонально-поликлональными антителами (Wide et al., in Kirkham и Hunter, eds., *Radioimmunoassay Methods*, E. и S. Livingstone, Edinburgh (1970)); вестерн-блоттинг Gordon et al. (Патент США №. 4452901); иммунопреципитация меченого лиганда (Brown et al., *J. Biol. Chem.*, 255:4980-4983 (1980)); твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) как описано, например, в Raines et al., *J. Biol. Chem.*, 257:5154-5160 (1982); иммуноцитохимические методы, включая использование флуорохромов (Brooks et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 39:477 (1980)); и нейтрализация активности (Bowen-Pope et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:2396-2400 (1984)). В дополнение к иммуноанализам, описанным выше, доступен ряд других иммуноанализов, включая те, которые описаны в патентах США №№ 3817827, 3850752, 3901654, 3935074, 3984533, 3996345, 4034074 и 4098876. Сведения, сообщаемые

по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Неограничивающий пример модели *in vivo* для обнаружения иммунного ответа включает анализ индукции мышинового цитокина *in vivo*, как описано, например, в Judge et al., *Mol. Ther.*, 13:494-505 (2006). В определенных вариантах осуществления анализ, который можно проводить следующим образом: (1) миРНК можно вводить стандартной внутривенной инъекцией в боковую хвостовую вену; (2) кровь можно собрать сердечной пункцией примерно через 6 часов после введения и выделить плазму для анализа цитокинов; и (3) цитокины могут быть количественно определены с использованием наборов для сэндвич-анализа ИФА в соответствии с инструкциями производителя (например, IFN- α мыши и человека (PBL Biomedical; Пискатауэй, Нью-Джерси); человеческий IL-6 и TNF- α (eBioscience; Сан-Диего, Калифорния); и мышинный IL-6, TNF- α и IFN- γ (BD Biosciences; Сан-Диего, Калифорния)).

Моноклональные антитела, которые специфически связывают цитокины и факторы роста, коммерчески доступны из множества источников и могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники (см., например, Kohler et al., *Nature*, 256: 495-497 (1975) and Harlow and Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, New York (1999)). Получение моноклональных антител было описано ранее и может быть выполнено любыми способами, известными в данной области техники (Buhring et al., in *Hybridoma*, Vol. 10, No. 1, pp. 77-78 (1991)). В некоторых методах моноклональные антитела метят (например, любым составом, определяемым спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, электрическими, оптическими или химическими методами) для облегчения обнаружения.

Получение молекул миРНК

миРНК может быть представлена в нескольких формах, включая, например, в виде одного или большего числа изолированных дуплексов малых интерферирующих РНК (миРНК), в виде удлинённых двухцепочечных РНК (дцРНК) или в виде миРНК, или дцРНК, транскрибированной из транскрипционной кассеты в плазмидной ДНК. Последовательности миРНК могут иметь выступы (например, 3'- или 5'-выступы, как описано в Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188 (2001) или Nykänen et al., *Cell*, 107:309 (2001) или могут не иметь выступов (т. е. иметь тупые концы).

Популяция РНК может использоваться для получения длинных РНК-предшественников, или длинные РНК-предшественники, которые имеют существенную или полную идентичность с выбранной последовательностью-мишенью, могут использоваться для создания миРНК. РНК можно выделить из клеток или ткани, синтезировать и/или клонировать способами, хорошо известными специалистам в данной области. РНК может быть смешанной популяцией (полученной из клеток или ткани, транскрибированной с кДНК, вычтенной, отобранной и т. д.) или может представлять одну последовательность-мишень. РНК может быть природной (например, выделенной из образцов ткани или клеток), синтезированной *in vitro* (например, с использованием

полимеразы T7 или SP6 и продуктов ПЦР или клонированной кДНК) или синтезированной химическим путем.

Для образования длинной дцРНК для синтетических РНК комплемент также транскрибируется *in vitro* и гибридизируется с образованием дцРНК. Если используется популяция встречающейся в природе РНК, также предоставляются РНК-комплементы (например, для образования дцРНК для расщепления РНКазой III *E. coli* или дайсер), например, путем транскрипции кДНК, соответствующей популяции РНК, или путем использования РНК-полимераз. Затем предшественники РНК гибридизируют с образованием двухцепочечных РНК для расщепления. дцРНК можно вводить непосредственно субъекту или их можно расщеплять *in vitro* перед введением.

Способы выделения РНК, синтеза РНК, гибридизации нуклеиновых кислот, создания и скрининга библиотек кДНК и проведения ПЦР хорошо известны в данной области (см., например, Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*), как и методы ПЦР (см. патенты США №№ 4,683,195 и 4,683,202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)). Библиотеки экспрессируемых последовательностей также хорошо известны специалистам в данной области. Дополнительные базовые тексты, раскрывающие общие методы использования в этом изобретении, включают Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); и *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994). Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Предпочтительно миРНК являются химически синтезированными. Олигонуклеотиды, которые содержат молекулы миРНК настоящего изобретения, можно синтезировать с применением любого из способов, известных в данной области техники, таких как описанные в Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); и Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). В синтезе олигонуклеотидов применяются обычные защитные и соединяющие группы нуклеиновых кислот, такие как диметокситритил на 5'-конце и фосфорамидиты на 3'-конце. В качестве неограничивающего примера, можно осуществить маломасштабный процесс синтеза с помощью синтезатора производства компании Applied Biosystems, с применением протокола масштабирования 0,2 мкмоль. В качестве альтернативы, синтез в масштабе 0,2 мкмоль можно осуществить с помощью 96-луночного планшетного синтезатора производства компании Protogene (Пало-Алто, Калифорния). Однако, синтезы большего или меньшего масштаба также относятся к объему данного изобретения. Подходящие реагенты для синтеза олигонуклеотидов, способы снятия защитной группы с РНК и способы очистки РНК известны специалистам в данной области техники.

Молекулы миРНК также можно синтезировать с помощью техники тандемного синтеза, при которой обе цепи синтезируются как единый непрерывный

олигонуклеотидный фрагмент или цепь, разделенные расщепляемым линкером, который впоследствии расщепляется с получением отдельных фрагментов или цепей, которые гибридизируются с образованием дуплекса миРНК. Линкер может быть полинуклеотидным линкером или ненуклеотидным линкером. Тандемный синтез миРНК может быть легко адаптирован как для платформ многолучочного/многопланшетного синтеза, так и для крупномасштабных платформ синтеза, использующих реакторы периодического действия, колонки для синтеза и т.п. В качестве альтернативы, молекулы миРНК могут быть составлены из двух различных олигонуклеотидов, один из которых содержит смысловую цепь, а другой содержит антисмысловую цепь миРНК. Например, каждую цепь можно синтезировать по отдельности и соединить друг с другом путем гибридизации или лигирования, после синтеза и/или снятия защитной группы. В определенных других случаях молекулы миРНК могут быть синтезированы как единый непрерывный олигонуклеотидный фрагмент, где самокомплементарные смысловые и антисмысловые области гибридизируются с образованием дуплекса миРНК, имеющего шпильку вторичной структуры.

Модификация последовательностей миРНК

В определенных аспектах молекулы миРНК содержат дуплекс, имеющий две цепи и по меньшей мере один модифицированный нуклеотид в двухцепочечной области, где каждая цепь имеет длину от около 15 до около 60 нуклеотидов. Преимущественно модифицированная миРНК является менее иммуностимулирующей, чем соответствующая немодифицированная последовательность миРНК, но сохраняет способность подавлять экспрессию целевой последовательности. В предпочтительных вариантах осуществления степень химических модификаций, введенных в молекулу миРНК, обеспечивает баланс между снижением или отменой иммуностимулирующих свойств миРНК и сохранением активности РНКи. В качестве неограничивающего примера молекула миРНК, которая нацелена на интересующий ген, может быть минимально модифицирована (например, менее чем около на 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% модифицирована) по селективным нуклеотидам уридина и/или гуанозина в дуплексе миРНК для устранения иммунного ответа, генерируемого миРНК, при сохранении ее способности подавлять экспрессию целевого гена.

Примеры модифицированных нуклеотидов, подходящих для использования в изобретении, включают, но не ограничиваются ими, рибонуклеотиды, содержащие 2'-О-метил(2'OMe), 2'-дезоксидезокси-2'-фтор(2'F), 2'-деокси, 5-С-метил, 2'-О-(2-метоксиэтил) (МОЕ), 4'-тио, 2'-амино или 2'-С-аллильную группу. Модифицированные нуклеотиды, имеющие Нозерн-конформацию, такую как описанные, например, в Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag Ed. (1984), также подходят для использования в молекулах миРНК. Такие модифицированные нуклеотиды включают, без ограничения, нуклеотиды заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA) (например, 2'-О, 4'-С-метилден- (D-рибофуранозил)нуклеотиды), 2'-О-(2-метоксиэтил) (МОЕ) нуклеотиды, 2'-метилтиоэтилнуклеотиды, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор(2'F) нуклеотиды, 2'-дезоксидезокси-2'-хлор (2'Cl)

нуклеотиды и 2'-азидонуклеотиды. В определенных случаях описанные в данном документе молекулы миРНК содержат один или более нуклеотидов G-Clamp. Нуклеотид с G-фиксирующим основанием относится к модифицированному аналогу цитозина, в котором модификации придают способность связывать водородные связи с гранями Уотсона-Крика и Хугстена комплементарного гуанинового нуклеотида в дуплексе (см., например, Lin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 120:8531-8532 (1998)). Кроме того, в молекулы миРНК могут быть включены нуклеотиды, имеющие аналог нуклеотидного основания, такой как, например, С-фенил, С-нафтил, другие ароматические производные, инозин, азолкарбоксамиды и производные нитроазола, такие как 3-нитропиррол, 4-нитроиндол, 5-нитроиндол и 6-нитроиндол (см., например, Loakes, *Nucl. Acids Res.*, 29:2437-2447 (2001)).

В определенных вариантах осуществления молекулы миРНК могут дополнительно содержать одну или более химических модификаций, таких как концевые кэп-фрагменты, модификации фосфатного остова и тому подобное. Примеры концевых кэп-фрагментов включают, без ограничения, инвертированные дезоксиабазные остатки, модификации глицерина, 4',5'-метиленовые нуклеотиды, 1-(β -D-эритрофуранозил)нуклеотиды, 4'-тионуклеотиды, карбоциклические нуклеотиды, 1,5-ангидрогекситолнуклеотиды, L-нуклеотиды, α -нуклеотиды, модифицированные основные нуклеотиды, треопентофуранозильные нуклеотиды, ациклические 3',4'-секонуклеотиды, ациклические 3,4-дигидроксибутильные нуклеотиды, ациклические 3,5-дигидроксипентильные нуклеотиды, 3'-3'-инвертированные нуклеотидные фрагменты, 3'-3'-инвертированные базовые фрагменты, 3'-2'-инвертированные нуклеотидные фрагменты, 3'-2'-инвертированные базовые фрагменты, 5'-5'-инвертированные нуклеотидные фрагменты, 5'-5'-инвертированные базовые фрагменты, 3'-5'-инвертированные дезоксиабазные фрагменты, 5'-аминоалкилфосфат, 1,3-диамино-2-пропилфосфат, 3-аминопропилфосфат, 6-аминогексилфосфат, 1,2-аминододецилфосфат, гидроксипропилфосфат, 1,4-бутандиолфосфат, 3'-фосфорамидат, 5'-фосфорамидат, гексилфосфат, аминогексилфосфат, 3'-фосфат, 5'-амино, 3'-фосфоротиоат, 5'-фосфоротиоат, фосфородитиоат и мостиковые или немостиковые метилфосфонатные или 5'-меркаптофрагменты (см., например, патент США № 5,998,203; Beaucage et al., *Tetrahedron* 49:1925 (1993)). Неограничивающие примеры модификаций фосфатного остова (т.е. приводящие к модифицированным межнуклеотидным связям) включают фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, метилфосфонатные, фосфотриэфирные, морфолиновые, амидатные, карбаматные, карбоксиметилловые, ацетамидатные, полиамидные, сульфонатные, сульфонамидные, сульфаматные, формацетальные, тиоформацетальные и алкилсилильные замещения (см., например, Hunziker et al., *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, in *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, in *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Такие химические модификации могут происходить на 5'-конце и/или 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях миРНК. Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и/или антисмысловая цепь молекулы миРНК может дополнительно содержать 3'-концевой выступ, содержащий от около 1 до около 4 (например, 1, 2, 3 или 4) 2'-дезоксирибонуклеотидов и/или любую комбинацию модифицированных и немодифицированных нуклеотидов. Дополнительные примеры модифицированных нуклеотидов и типов химических модификаций, которые могут быть введены в молекулы миРНК, описаны, например, в патенте Великобритании № GB 2397818 В и в публикациях патентов США № 20040192626, 20050282188 и 20070135372, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Описанные в данном документе молекулы миРНК могут необязательно содержать один или более ненуклеотидов в одной или обеих цепях миРНК. Используемый в данном документе термин «ненуклеотид» относится к любой группе или соединению, которое может быть включено в цепь нуклеиновой кислоты вместо одной или более нуклеотидных единиц, включая замещения сахара и/или фосфата, и позволяет остальным основаниям проявлять свою активность. Группа или соединение являются абазическими в том смысле, что они не содержат общепризнанного нуклеотидного основания, такого как аденозин, гуанин, цитозин, урацил или тимин, и, следовательно, не имеют основания в 1'-положении.

В других вариантах осуществления химическая модификация миРНК включает присоединение конъюгата к молекуле миРНК. Конъюгат может быть присоединен к 5'-и/или 3'-концу смысловой и/или антисмысловой цепи миРНК посредством ковалентного присоединения, такого как, например, биоразлагаемый линкер. Конъюгат также может быть присоединен к миРНК, например, через карбаматную группу или другую связывающую группу (см., например, публикации патентов США №№ 20050074771, 20050043219 и 20050158727). В определенных случаях конъюгат представляет собой молекулу, которая облегчает доставку миРНК в клетку. Примеры молекул конъюгата, подходящих для присоединения к миРНК, включают, без ограничения, стероиды, такие как холестерин, гликоли, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ), сывороточный альбумин человека (HSA), жирные кислоты, каротиноиды, терпены, желчные кислоты, фолаты (например, фолиевую кислоту, аналоги фолиевой кислоты и их производные), сахара (например, галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, маннозу, фруктозу, фукозу и т. д.), фосфолипиды, пептиды, лиганды для клеточных рецепторов, способных опосредовать клеточное поглощение и их комбинации (см., например, публикации патентов США №№ 20030130186, 20040110296 и 20040249178; патент США № 6753423). Другие примеры включают липофильный фрагмент, витамин, полимер, пептид, белок, нуклеиновую кислоту, небольшую молекулу, олигосахарид, углеводный кластер, интеркалятор, вещество, связывающиеся с малой бороздой, расщепляющий агент и молекулы конъюгата сшивающего агента, описанные в публикациях патентов США № 20050119470 и 20050107325. Еще другие примеры включают 2'-О-алкиламин, 2'-β-алкоксиалкиламин, полиамин, C5-катионно-модифицированный пиримидин, катионный пептид, гуанидиниевую группу, амидиниевую группу, молекулы конъюгатов

катионных аминокислот, описанные в публикации патента США № 20050153337. Дополнительные примеры включают гидрофобную группу, мембрано-активное соединение, клеточно-проникающее соединение, сигнал нацеливания на клетку, модификатор взаимодействия и молекулы конъюгата стерического стабилизатора, описанные в публикации патента США № 20040167090. Дополнительные примеры включают молекулы конъюгата, описанные в публикации патента США № 20050239739. Тип используемого конъюгата и степень конъюгации с молекулой миРНК можно оценивать для улучшения фармакокинетических профилей, биодоступности и/или стабильности миРНК при сохранении активности РНКи. Таким образом, специалист в данной области может провести скрининг молекул миРНК с различными присоединенными конъюгатами для идентификации молекул, обладающих улучшенными свойствами и полной активностью РНКи, с использованием любой из множества хорошо известных культур клеток *in vitro* или моделей животных *in vivo*. Раскрытия указанных выше патентных документов полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Целевые гены

В определенных вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты (например, миРНК) частиц на основе нуклеиновой кислоты и липида, описанных в данном документе, может использоваться для подавления или отключения трансляции (т.е. экспрессии) интересующего гена. Представляющие интерес гены включают, но не ограничиваются ими, гены, связанные с вирусной инфекцией и выживанием, гены, связанные с метаболическими заболеваниями и расстройствами (например, заболеваниями и расстройствами печени), гены, связанные с онкогенезом и трансформацией клеток (например, рак), ангиогенные гены, гены иммуномодуляторов, такие как гены, связанные с воспалительными и аутоиммунными ответами, гены рецепторов лигандов и гены, связанные с нейродегенеративными расстройствами. В определенных вариантах осуществления интересующий ген экспрессируется в гепатоцитах.

Гены, связанные с вирусной инфекцией и выживанием, включают гены, экспрессируемые вирусом для связывания, проникновения и репликации в клетке. Особый интерес представляют вирусные последовательности, ассоциированные с хроническими вирусными заболеваниями. Вирусные последовательности, представляющие особый интерес, включают последовательности филовирусов, таких как вирус Эбола и вирус Марбург (см., например, Geisbert et al., *J. Infect. Dis.*, 193:1650-1657 (2006)); аренавирусы, такие как вирус Ласса, вирус Хунин, вирус Мачупо, вирус Гуанарито и вирус Сабиа (Buchmeier et al., *Arenaviridae: the viruses and their replication*, In: *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, (2001)); вирусы гриппа, такие как вирусы гриппа А, В и С (см., например, Steinhauer et al., *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002); и Neumann et al., *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002)); вирусы гепатита (см., например, Hamaoka et al., *FEBS Lett.*, 543:51 (2003); Yokota et al., *EMBO Rep.*, 4:602 (2003);

Schlomai et al., *Hepatology*, 37:764 (2003); Wilson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2783 (2003); Kapadia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2014 (2003); и *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001)); вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (Banerjee et al., *Mol. Ther.*, 8:62 (2003); Song et al., *J. Virol.*, 77:7174 (2003); Stephenson, *JAMA*, 289:1494 (2003); Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:183 (2003)); вирусы герпеса (Jia et al., *J. Virol.*, 77:3301 (2003)); и вирусы папилломы человека (HPV) (Hall et al., *J. Virol.*, 77:6066 (2003); Jiang et al., *Oncogene*, 21:6041 (2002)).

Примеры последовательностей нуклеиновых кислот филовируса, экспрессию которых можно ингибировать, включают, но не ограничиваются ими, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие структурные белки (например, VP30, VP35, нуклеопротеин (NP), белки полимеразы (L-pol)) и мембраносвязанные белки (например, VP40, гликопротеин (GP), VP24). Полные последовательности генома вируса Эбола изложены, например, в Genbank под номерами доступа NC-002549; AY769362; NC-006432; NC-004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; и AF086833. Последовательности вируса Эбола VP24 изложены, например, в Genbank под номерами доступа U77385 и AY058897. Последовательности вируса Эбола L-pol изложены, например, в Genbank под номером доступа X67110. Последовательности вируса Эбола VP40 изложены, например, в Genbank под номером доступа AY058896. Последовательности вируса Эбола NP изложены, например, в Genbank под номерами доступа AY058895. Последовательности вируса Эбола GP изложены, например, в Genbank под номером доступа AY058898; Sanchez et al., *Virus Res.*, 29:215-240 (1993); Will et al., *J. Virol.*, 67:1203-1210 (1993); Volchkov et al., *FEBS Lett.*, 305:181-184 (1992); и в патенте США № 6713069. Дополнительные последовательности вируса Эбола изложены, например, в Genbank под номерами доступа L11365 и X61274. Полные геномные последовательности вируса Марбург изложены, например, в Genbank под номерами доступа NC-001608; AY430365; AY430366; и AY358025. Последовательности вируса Марбург GP изложены, например, в Genbank под номерами доступа AF005734; AF005733; и AF005732. Последовательности вируса Марбург VP35 изложены, например, в Genbank под номерами доступа AF005731 и AF005730. Дополнительные последовательности вируса Марбург изложены, например, в Genbank под номерами доступа X64406; Z29337; AF005735; и Z12132. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на последовательности нуклеиновых кислот вируса Эбола и вируса Марбург, включают те, которые описаны в патентной публикации США № 20070135370, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Примеры последовательностей нуклеиновых кислот вируса гриппа, экспрессию которых можно ингибировать, включают, помимо прочего, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие нуклеопротеин (NP), матричные белки (M1 и M2), неструктурные белки (NS1 и NS2), РНК-полимеразу (PA, PB1, PB2), нейраминидазу (NA) и гемагглютинин (HA). Последовательности NP гриппа А изложены, например, в Genbank под номерами доступа: NC-004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046;

AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; и AY818140. Последовательности РА гриппа А изложены, например, в Genbank под номерами доступа: AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; и AY724786. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на последовательности нуклеиновых кислот вируса гриппа, включают те, которые описаны в патентной публикации США № 20070218122, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей

Примеры последовательностей нуклеиновых кислот вируса гепатита, экспрессию которых можно ингибировать, включают, но не ограничиваются ими, последовательности нуклеиновых кислот, участвующие в транскрипции и трансляции (например, En1, En2, X, P), и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие структурные белки (например, коровые белки, включая белок С и С-родственные белки, белки капсида и оболочки, включая белки S, М и/или L или их фрагменты) (см., например, FIELDS VIROLOGY, выше). Примеры последовательностей нуклеиновых кислот вируса гепатита С (HCV), экспрессию которых можно ингибировать, включают, но не ограничиваются ими, 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), 3'-нетранслируемую область (3'-UTR), область кодона инициации трансляции полипротеина, последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES) и/или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие коровый белок, белок E1, белок E2, белок р7, белок NS2, протеазу/геликазу NS3, белок NS4A, белок NS4B, белок NS5A и/или РНК-зависимую РНК-полимеразу NS5B. Последовательности генома HCV изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-004102 (HCV генотип 1a), AJ238799 (HCV генотип 1b), NC-009823 (HCV генотип 2), NC-009824 (HCV генотип 3), NC-009825 (HCV генотип 4), NC-009826 (HCV генотип 5) и NC-009827 (HCV генотип 6). Последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита А изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-001489; последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита В изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-003977; последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита D изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-001653; Последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита Е изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-001434; и последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита G изложены, например, в номере доступа в Genbank NC-001710. Подавление экспрессии последовательностей, кодирующих гены, связанные с вирусной инфекцией и выживанием, можно удобно использовать в сочетании с введением обычных средств, используемых для лечения вирусного заболевания. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на

последовательности нуклеиновых кислот вируса гепатита, включают те, которые описаны в патентных публикациях США №№ 20060281175, 20050058982 и 20070149470; патенте США № 7348314; и предварительной заявке США № 61/162127, поданной 20 марта 2009 г., описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Гены, связанные с метаболическими заболеваниями и расстройствами (например, расстройства, при которых печень является мишенью, и заболеваниями и расстройствами печени), включают, например, гены, экспрессируемые при дислипидемии (например, рецепторы X печени, такие как LXR α and LXR β (номер доступа в Genbank NM-007121), рецепторов фарнезоида X (FXR) (номер доступа в Genbank NM-005123), белка, связывающего регуляторный элемент стерола (SREBP), протеазы сайта-1 (SIP), 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент-А-редуктазы (HMG-кофермент-А-редуктазы), аполипопротеина В (ApoB) (номер доступа в Genbank NM-000384), аполипопротеина СIII (ApoC3) (номера доступа в Genbank NM-000040 и NG-008949 REGION: 5001.8164) и аполипопротеина Е (ApoE) (номера доступа в Genbank NM-000041 и NG-007084 REGION: 5001.8612)); и при диабете (например, глюкозо-6-фосфатазы) (см., например, Forman et al., *Cell*, 81:687 (1995); Seol et al., *Mol. Endocrinol.*, 9:72 (1995), Zavacki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7909 (1997); Sakai et al., *Cell*, 85:1037-1046 (1996); Duncan et al., *J. Biol. Chem.*, 272:12778-12785 (1997); Willy et al., *Genes Dev.*, 9:1033-1045 (1995); Lehmann et al., *J. Biol. Chem.*, 272:3137-3140 (1997); Janowski et al., *Nature*, 383:728-731 (1996); и Peet et al., *Cell*, 93:693-704 (1998)). Специалист в данной области поймет, что гены, связанные с метаболическими заболеваниями и расстройствами (например, заболеваниями и расстройствами, при которых печень является мишенью, и заболеваниями и расстройствами печени), включают гены, которые экспрессируются в самой печени, а также гены, экспрессируемые в других органах и тканях. Подавление экспрессии последовательностей, кодирующих гены, связанные с метаболическими заболеваниями и нарушениями, можно удобно использовать в сочетании с введением обычных средств, используемых для лечения заболевания или нарушения. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на ген ApoB, включают те, что описаны в патентной публикации США № 20060134189, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на ген ApoC3, включают те, которые описаны в предварительной заявке США № 61/147235, поданной 26 января 2009 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Примеры последовательностей генов, связанных с онкогенезом и трансформацией клеток (например, раком или другой неоплазией), включают митотические кинезины, такие как Eg5 (KSP, KIF11; номер доступа в Genbank NM-004523); серин/треониновые киназы, такие как polo-подобная киназа 1 (PLK-1) (номер доступа в Genbank NM-005030; Barr et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5:429-440 (2004)); тирозинкиназы, такие как WEE1 (номера доступа в Genbank NM-003390 и NM-001143976); ингибиторы апоптоза, такие как

XIAP (номер доступа в Genbank NM-001167); субъединицы сигнасомы COP9, такие как CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; номер доступа в Genbank NM-006837); CSN6, CSN7A, CSN7B и CSN8; убиквитинлигазы, такие как COP1 (RFWD2; номера доступа в Genbank NM-022457 и NM-001001740); и гистоновые деацетилазы, такие как HDAC1, HDAC2 (номера доступа в Genbank NM-001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, т.д. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на гены Eg5 и XIAP, включают молекулы, описанные в заявке на патент США № № 11/807872, поданной 29 октября 2007 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на ген PLK-1, включают молекулы, описанные в патентных публикациях США №№ 20050107316 и 20070265438; и заявке на патент США №. № 12/343 342, поданной 23 октября 2008 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на ген CSN5, включают те, которые описаны в предварительной заявке США № 61/045251, поданной 15 апреля 2008 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Дополнительные примеры последовательностей генов, связанных с онкогенезом и трансформацией клеток, включают последовательности транслокации, такие как гены слияния MLL, BCR-ABL (Wilda et al., *Oncogene*, 21:5716 (2002); Scherr et al., *Blood*, 101:1566 (2003)), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO и AML1-MTG8 (Heidenreich et al., *Blood*, 101:3157 (2003)); сверхэкспрессированные последовательности, такие как гены множественной лекарственной устойчивости (Nieth et al., *FEBS Lett.*, 545:144 (2003); Wu et al., *Cancer Res.* 63:1515 (2003)), циклины (Li et al., *Cancer Res.*, 63:3593 (2003); Zou et al., *Genes Dev.*, 16:2923 (2002)), бета-катенин (Verma et al., *Clin Cancer Res.*, 9:1291 (2003)), гены теломеразы (Kosciolek et al., *Mol Cancer Ther.*, 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, рецепторы факторов роста (например, EGFR/ErbB1 (номера доступа в Genbank NM-005228, NM-201282, NM-201283 и NM-201284; см. также Nagy et al. *Exp. Cell Res.*, 285:39-49 (2003), ErbB2/HER-2 (номера доступа в Genbank NM-004448 и NM-001005862), ErbB3 (номера доступа в Genbank NM-001982 и NM-001005915), и ErbB4 (номера доступа в Genbank NM-005235 и NM-001042599); и мутированные последовательности, такие как RAS (обзор в Tuschl and Borkhardt, *Mol. Interventions*, 2:158 (2002)). Неограничивающие примеры молекул миРНК, нацеленных на ген EGFR, включают молекулы, описанные в заявке на патент США № № 11/807872, поданной 29 октября 2007 г., описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Подавление экспрессии последовательностей, кодирующих ферменты репарации ДНК, находит применение в сочетании с введением химиотерапевтических агентов. (Collis et al., *Cancer Res.*, 63:1550 (2003)). Гены, кодирующие белки, связанные с миграцией опухоли, также являются представляющими интерес последовательностями-мишенями, например интегрины, селектины и металлопротеиназы. Приведенные выше

примеры не являются исключительными. Специалисты в данной области поймут, что любая целая или частичная последовательность гена, которая облегчает или способствует онкогенезу или трансформации клеток, росту опухоли или миграции опухоли, может быть включена в качестве матричной последовательности.

Ангиогенные гены способны способствовать образованию новых сосудов. Особый интерес представляет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) (Reich et al., *Mol. Vis.*, 9:210 (2003)) или VEGFR. Последовательности миРНК, нацеленные на VEGFR, изложены, например, в GB 2396864; публикации патента США № 20040142895; и CA 2456444, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Антиангиогенные гены способны подавлять неоваскуляризацию. Эти гены особенно полезны для лечения тех видов рака, при которых ангиогенез играет роль в патологическом развитии заболевания. Примеры антиангиогенных генов включают, но не ограничиваются ими, эндостатин (см., например, патент США № 6174861), ангиостатин (см., например, патент США № 5639725 США) и VEGFR2 (см., например, Decaussin et al., *J. Pathol.*, 188: 369-377 (1999)), описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей. Гены иммуномодулятора - это гены, которые модулируют один или более иммунных ответов. Примеры генов иммуномодуляторов включают, без ограничения, цитокины, такие как факторы роста (например, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, и т.д.), интерлейкины (например, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill et al., *J. Immunol.*, 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, и т.д.), интерфероны (например, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , т.д.) и TNF. Гены Fas и лигандов Fas также являются представляющими интерес последовательностями-мишенями иммуномодулятора (Song et al., *Nat. Med.*, 9:347 (2003)). Гены, кодирующие вторичные сигнальные молекулы в гемопоэтических и лимфоидных клетках, также включены в данное изобретение, например, киназы семейства Tec, такие как тирозинкиназа Брутона (Btk) (Heinonen et al., *FEBS Lett.*, 527:274 (2002)).

Лиганды клеточных рецепторов включают лиганды, которые способны связываться с рецепторами клеточной поверхности (например, рецептором инсулина, рецептором ЭПО, рецепторами, связанными с G-белком, рецепторами с активностью тирозинкиназы, рецепторами цитокинов, рецепторами факторов роста и т. д.), чтобы модулировать (например, ингибировать, активировать и т. д.) физиологический путь, в котором рецептор участвует (например, модуляция уровня глюкозы, развитие клеток крови, митогенез и т. д.) Примеры лигандов клеточных рецепторов включают, но не ограничиваются ими, цитокины, факторы роста, интерлейкины, интерфероны, эритропоэтин (ЭПО), инсулин, глюкагон, лиганды рецепторов, связанных с G-белком, и т. д. Шаблоны, кодирующие экспансию тринуклеотидных повторов (например, CAG-повторы), находят применение для подавления экспрессии патогенных последовательностей при нейродегенеративных расстройствах, вызванных экспансией тринуклеотидных повторов, таких как спинобульбулярная мышечная атрофия и болезнь

Хантингтона (Caplen et al., *Hum. Mol. Genet.*, 11:175 (2002)).

Некоторые другие гены-мишени, на которые может воздействовать нуклеиновая кислота (например, мРНК) для подавления или подавления экспрессии гена, включают, но не ограничиваются ими, альфа-актин-2 гладких мышц аорты (ACTA2), алкогольдегидрогеназа 1A (ADH1A), алкогольдегидрогеназа 4 (ADH4), алкогольдегидрогеназа 6 (ADH6), афамин (AFM), ангиотензиноген (AGT), серинпируватаминотрансфераза (AGXT), альфа-2-HS-гликопротеин (AHSG), член C4 семейства альдокеторедуктазы 1 (AKR1C4), сывороточный альбумин (ALB), альфа-1-микроглобулин/предшественник бикунина (AMBIP), ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3), амилоидный компонент Р сыворотки (APCS), аполипопротеин А-II (APOA2), аполипопротеин В-100 (APOB), аполипопротеин С3 (APOC3), аполипопротеин С-IV (APOC4), аполипопротеин F (APOF), бета-2-гликопротеин 1 (APOH), аквапорин-9 (AQP9), КоА желчных кислот: аминокислота N-ацилтрансфераза (BAAT), C4b-связывающий белок бета цепь (C4BPB), предполагаемый неохарактеризованный белок, кодируемый LINC01554 (C5orf27), фактор комплемента 3 (C3), фактор комплемента 5 (C5), фактор комплемента С6 (C6), фактор комплемента С8 альфа цепь (C8A), фактор комплемента С8 бета цепь (C8B), фактор комплемента С8 гамма цепь (C8G), фактор комплемента С9 (C9), связывающий кальмодулин активатор транскрипции 1 (CAMTA1), CD38 (CD38), фактор комплемента В (CFB), белок 1, связанный с фактором комплемента Н (CFHR1), белок 2, связанный с фактором комплемента Н (CFHR2), белок 3, связанный с фактором комплемента Н (CFHR3), каннабиноидный рецептор 1 (CNR1), церулоплазмин (CP), карбоксипептидаза В2 (CPB2), фактор роста соединительной ткани (CTGF), хемокин 2 с мотивом С-Х-С (CXCL2), цитохром Р450 1A2 (CYP1A2), цитохром Р450 2A6 (CYP2A6), цитохром Р450 2C8 (CYP2C8), цитохром Р450 2C9 (CYP2C9), цитохром Р450, семейство 2, подсемейство D, член 6 (CYP2D6), цитохром Р450 2E1 (CYP2E1), филлохинон омега-гидрокси CYP4F2 (CYP4F2), 7-альфа-гидроксихолест-4-ен-3-он-12-альфа-гидроксилаза (CYP8B1), дипептидилпептидаза 4 (DPP4), фактор свертывания крови 12 (F12), фактор свертывания крови II (тромбин) (F2), фактор свертывания крови IX (F9), альфа-цепь фибриногена (FGA), бета-цепь фибриногена (FGB), гамма-цепь фибриногена (FGG), фибриноген-подобный белок 1 (FGL1), флавиносодержащая монооксигеназа 3 (FMO3), флавиносодержащая монооксигеназа 5 (FMO5), группоспецифический компонент (белок, связывающий витамин D) (GC), рецептор гормона роста (GHR), глицин-N-метилтрансфераза (GNMT), гиалуронансвязывающий белок 2 (HABP2), антимикробный пептид гепсидина (HAMP), оксидаза гидроксикислот (гликолат оксидаза) 1 (HAO1), активатор HGF (HGFAC), белок, связанный с гаптоглобином; гаптоглобин (HPR), гемопексин (HPX), гликопротеин, богатый гистидином (HRG), гидроксистероид(11-бета)дегидрогеназа 1 (HSD11B1), гидроксистероид(17-бета)дегидрогеназа 13 (HSD17B13), тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина Н1 (ITIH1), тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина Н2 (ITIH2), тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина Н3 (ITIH3), тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина Н4 (ITIH4), прекалликреин

(KLKB1), лактатдегидрогеназа А (LDHA), антимикробный пептид 2, экспрессируемый печенью (LEAP2), хемотаксин 2, полученный из лейкоцитарных клеток (LECT2), липопротеин (а) (LPA), маннан-связывающая лектин-серинпротеаза 2 (MASP2), изоформа S-аденозилметионинсинтазы типа 1 (MAT1A), НАДФН-оксидаза 4 (NOX4), поли [АДФ-рибоза] полимеразы 1 (PARP1), параоксоназа 1 (PON1), параоксоназа 3 (PON3), витамин К-зависимый протеин С (PROC), ретинолдегидрогеназа 16 (RDH16), сывороточный амилоид А4, конститутивный (SAA4), сериндегидратаза (SDS), альфа-1-антитрипсин (SERPINA1), серпин А11 (SERPINA11), каллистатиин (SERPINA4), кортикостероидсвязывающий глобулин (SERPINA6), антитромбин-III (SERPINC1), гепариновый кофактор 2 (SERPIND1), член 1 семейства серпинов Н (SERPINH1), семейство транспортеров растворенных веществ 5, член 2 (SLC5A2), котранспортер натрия/желчной кислоты (SLC10A1), член 5 семейства носителей растворенных веществ 13 (SLC13A5), член 1 семейства носителей растворенных веществ 22 (SLC22A1), член 47 семейства носителей растворенных веществ 25 (SLC25A47), семейство носителей растворенных веществ 2, глюкозный транспортер тип 2 (SLC2A2), Натрий-связанный переносчик нейтральных аминокислот 4 (SLC38A4), член семейства переносчиков органических анионов 1В1 (SLCO1B1), сфингомиелинфосфодиэстераза 1 (SMPD1), сульфотрансфераза желчных солей (SULT2A1), тирозинаминотрансфераза (TAT), триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO2), семейство UDP-глюкуронозилтрансферазы 2, полипептид В10 (UGT2B10), семейство UDP-глюкуронозилтрансферазы 2, полипептид В15 (UGT2B15), семейство UDP-глюкуронозилтрансферазы 2, полипептид В4 (UGT2B4) и витронектин (VTN).

Помимо полезности для подавления экспрессии любого из описанных выше генов для терапевтических целей, определенные нуклеиновые кислоты (например, миРНК), описанные в данном документе, также полезны в исследованиях и разработках, а также в диагностических, профилактических, прогностических, клинических и других применениях в здравоохранении. В качестве неограничивающего примера определенные нуклеиновые кислоты (например, миРНК) могут быть использованы в исследованиях ратификации цели, направленных на проверку того, может ли представляющий интерес ген потенциально быть терапевтической мишенью. Определенные нуклеиновые кислоты (например, миРНК) также можно использовать в исследованиях по идентификации мишеней, направленных на обнаружение генов в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

CRISPR

Целевое редактирование генома превратилось из нишевой технологии в способ, используемый многими исследователями-биологами. Этот прогресс в значительной степени подпитывается появлением технологии коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) (см., например, Sander et al., *Nature Biotechnology*, 32(4), 347-355, включая дополнительную информацию (2014) и международные публикации № WO 2016/197132 и WO 2016/197133). Соответственно, в

данном документе представлены усовершенствования (например, липидные наночастицы и их составы), которые можно использовать в сочетании с технологией CRISPR для лечения заболеваний, таких как HBV. Что касается целей для использования CRISPR, гидовая РНК (гРНК), используемая в технологии CRISPR, может быть разработана для нацеливания на конкретно идентифицированные последовательности, *например*, гены-мишени, *например*, генома HBV. Примеры таких целевых последовательностей приведены в международной публикации WO 2016/197132. Кроме того, международная публикация № WO 2013/151665 (*например*, см. таблицу 6; этот документ специально включен посредством ссылки, в частности, включая таблицу 6 и связанный с ней перечень последовательностей) описывает около 35000 последовательностей мРНК, заявленных в контексте экспрессионной конструкции мРНК. В определенных вариантах осуществления данного изобретения используется технология CRISPR для нацеливания на экспрессию любой из этих последовательностей. В определенных вариантах осуществления данного изобретения может также использоваться технология CRISPR для нацеливания на экспрессию обсуждаемого в данном документе гена-мишени.

аиРНК

Подобно миРНК, асимметричная интерферирующая РНК (аиРНК) может рекрутировать РНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (RISC) и приводить к эффективному подавлению экспрессии множества генов в клетках млекопитающих, опосредуя специфичное для последовательности расщепление целевой последовательности между нуклеотидами 10 и 11 относительно 5'-конца антисмысловой цепи (Sun et al., Nat. Biotech., 26:1379-1382 (2008)). Обычно молекула аиРНК содержит короткий дуплекс РНК, имеющий смысловую и антисмысловую цепи, причем дуплекс содержит выступы на 3'- и 5'-концах антисмысловой цепи. аиРНК обычно асимметрична, потому что смысловая цепь короче на обоих концах по сравнению с комплементарной антисмысловой цепью. В некоторых аспектах молекулы аиРНК могут быть сконструированы, синтезированы и отождествлены в условиях, аналогичных тем, которые используются для молекул миРНК. В качестве неограничивающего примера последовательности аиРНК могут быть выбраны и созданы с использованием описанных выше способов выбора последовательностей миРНК.

В другом варианте осуществления дуплексы аиРНК различной длины (например, около 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 или 14-17 пар оснований, более типично 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или пар оснований) могут быть сконструированы с выступами на 3'- и 5'-концах антисмысловой цепи для нацеливания на интересующую мРНК. В определенных случаях смысловая цепь молекулы аиРНК составляет около 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 или 14-17 нуклеотидов в длину, чаще всего 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов в длину. В определенных других случаях длина антисмысловой цепи молекулы аиРНК составляет около 15-60, 15-50 или 15-40 нуклеотидов, более типично около 15-30, 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину, и предпочтительно составляет около 20-24, 21-22 или 21-23 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления 5'-выступ на антисмысловой цепи содержит один, два, три, четыре или более нецелевых нуклеотидов (например, «AA», «UU», «dTdT» и т.д.). В других вариантах осуществления 3'-выступ на антисмысловой цепи содержит один, два, три, четыре или более нецелевых нуклеотидов (например, «AA», «UU», «dTdT» и т.д.). В определенных аспектах описанные в данном документе молекулы айРНК могут содержать один или более модифицированных нуклеотидов, например, в двухцепочечной (дуплексной) области и/или в антисмысловых выступах. В качестве неограничивающего примера последовательности айРНК могут содержать один или более модифицированных нуклеотидов, описанных выше для последовательностей миРНК. В предпочтительном варианте осуществления молекула айРНК содержит 2'ОМе-нуклеотиды, такие как, например, 2'ОМе-гуанозиннуклеотиды, 2'ОМе-уридиннуклеотиды или их смеси.

В определенных вариантах осуществления молекулы айРНК могут содержать антисмысловую цепь, которая соответствует антисмысловой цепи молекулы миРНК, например, одной из молекул миРНК, описанных в данном документе. В других вариантах осуществления молекулы айРНК могут использоваться для подавления экспрессии любого из указанных выше генов-мишеней, таких как, например, гены, связанные с вирусной инфекцией и выживанием, гены, связанные с метаболическими заболеваниями и расстройствами, гены, связанные с онкогенезом и трансформацией клеток, ангиогенные гены, гены иммуномодуляторов, такие как гены, связанные с воспалительными и аутоиммунными ответами, гены рецепторов лигандов и гены, связанные с нейродегенеративными расстройствами.

МикроРНК

Обычно микроРНК (миРНК) представляют собой одноцепочечные молекулы РНК длиной около 21-23 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию генов. микроРНК кодируются генами, из ДНК которых они транскрибируются, но микроРНК не транслируются в белок (некодирующая РНК); вместо этого каждый первичный транскрипт (пре-миРНК) преобразуется в короткую структуру «петля-на-стебле», называемую пре-миРНК, и, наконец, в функциональную зрелую микроРНК. Зрелые молекулы микроРНК частично или полностью комплементарны одной или более молекулам информационной РНК (мРНК), и их основная функция заключается в подавлении экспрессии генов. Идентификация молекул микроРНК описана, например, в Lagos-Quintana et al., *Science*, 294:853-858; Lau et al., *Science*, 294:858-862 и Lee et al., *Science*, 294:862-864.

Гены, кодирующие микроРНК, намного длиннее, чем процессированная зрелая молекула микроРНК. микроРНК сначала транскрибируются в виде первичных транскриптов или пре-миРНК с кэпом и полиаденильным хвостом и процессируются в короткие, ~70-нуклеотидные структуры «петля-на-стебле», известные как пре-миРНК в ядре клетки. Этот процессинг выполняется у животных с помощью белкового комплекса, известного как микропроцессорный комплекс, состоящего из нуклеазы Droscha и двухцепочечного РНК-связывающего белка Pasha (Denli et al., *Nature*, 432:231-235 (2004)).

Эти пре-миРНК затем процессируются с образованием зрелой микроРНК в цитоплазме за счет взаимодействия с эндонуклеазой Dicer, которая также инициирует образование РНК-индуцируемого сайленсинг-комплекса (RISC) (Bernstein et al., Nature, 409:363-366 (2001)). Либо смысловая цепь, либо антисмысловая цепь ДНК может функционировать как матрица, давая начало миРНК.

Когда дайсер расщепляет структуру «петля-на-стебле» пре-миРНК, образуются две комплементарные короткие молекулы РНК, но только одна интегрируется в комплекс RISC. Эта цепь известна как направляющая цепь и выбирается белком argonaute, каталитически активной РНКазой в комплексе RISC, на основе стабильности 5'-конца (Preall et al., Curr. Biol., 16:530-535 (2006)). Оставшаяся цепь, известная как антинаправляющая или сопровождающая цепь, деградирует как субстрат комплекса RISC (Gregory et al., Cell, 123:631-640 (2005)). После интеграции в активный комплекс RISC, микроРНК соединяются в пару с их комплементарными молекулами мРНК и вызывают деградацию целевой мРНК и/или трансляционное подавление экспрессии.

Молекулы микроРНК млекопитающих обычно комплементарны сайту в 3'-UTR последовательности мРНК-мишени. В определенных случаях отжиг микроРНК от целевой мРНК ингибирует трансляцию белка, блокируя аппарат трансляции белка. В определенных других случаях отжиг микроРНК от целевой мРНК облегчает расщепление и деградацию целевой мРНК посредством процесса, подобного РНК-интерференции (РНКи). микроРНК может также нацеливаться на метилирование геномных сайтов, которые соответствуют целевой мРНК. Как правило, микроРНК функционирует в ассоциации с набором белков, которые в совокупности называются микроРНК.

В определенных аспектах описанные в данном документе молекулы микроРНК имеют длину около 15-100, 15-90, 15-80, 15-75, 15-70, 15-60, 15-50 или 15-40 нуклеотидов, более типично около 15-30, 15-25 или 19-25 нуклеотидов в длину, предпочтительно около 20-24, 21-22 или 21-23 нуклеотидов в длину. В определенных других аспектах молекулы микроРНК могут содержать один или более модифицированных нуклеотидов. В качестве неограничивающего примера последовательности микроРНК могут содержать один или более модифицированных нуклеотидов, описанных выше для последовательностей миРНК. В предпочтительном варианте осуществления молекула микроРНК содержит 2'ОМе-нуклеотиды, такие как, например, 2'ОМе-гуанозиннуклеотиды, 2'ОМе-уридиннуклеотиды или их смеси.

В некоторых вариантах осуществления молекулы микроРНК могут использоваться для подавления экспрессии любого из указанных выше генов-мишеней, таких как, например, гены, связанные с вирусной инфекцией и выживанием, гены, связанные с метаболическими заболеваниями и расстройствами, гены, связанные с онкогенезом и трансформацией клеток, ангиогенные гены, гены иммуномодуляторов, такие как гены, связанные с воспалительными и аутоиммунными ответами, гены рецепторов лигандов и гены, связанные с нейродегенеративными расстройствами.

В других вариантах осуществления один или более агентов, которые блокируют активность микроРНК, направленную на интересующую мРНК, вводят с использованием липидной частицы по изобретению (например, частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида). Примеры блокирующих агентов включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды пространственного блокирования, олигонуклеотиды заблокированной нуклеиновой кислоты и морфолиноолигонуклеотиды. Такие блокирующие агенты могут связываться непосредственно с микроРНК или с сайтом связывания микроРНК на мРНК-мишени.

Антисмысловые олигонуклеотиды

В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, направленный на целевой ген или интересующую последовательность. Термины «антисмысловый олигонуклеотид» или «антисмысловый» включают олигонуклеотиды, комплементарные целевой полинуклеотидной последовательности. Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой отдельные цепи ДНК или РНК, комплементарные выбранной последовательности. Антисмысловые олигонуклеотиды РНК предотвращают трансляцию комплементарных цепей РНК путем связывания с РНК. Антисмысловые олигонуклеотиды ДНК можно использовать для нацеливания на специфическую комплементарную (кодирующую или некодирующую) РНК. Если происходит связывание, этот гибрид ДНК/РНК может расщепляться ферментом РНКазой H. В конкретном варианте осуществления антисмысловые олигонуклеотиды содержат от около 10 до около 60 нуклеотидов, более предпочтительно от около 15 до около 30 нуклеотидов. Термин также включает антисмысловые олигонуклеотиды, которые могут не быть точно комплементарными желаемому целевому гену. Таким образом, изобретение может быть использовано в случаях, когда нецелевые специфические активности обнаруживаются антисмысловой последовательностью или когда антисмысловая последовательность, содержащая одно или более несовпадений с целевой последовательностью, является наиболее предпочтительной для конкретного использования.

Было продемонстрировано, что антисмысловые олигонуклеотиды являются эффективными и целевыми ингибиторами синтеза белка и, следовательно, могут использоваться для специфического ингибирования синтеза белка целевым геном. Эффективность антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования синтеза белка хорошо известна. Например, синтез полигалактаураназы и ацетилхолиновый мускариновый рецептор типа 2 ингибируется антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на их соответствующие последовательности мРНК (см. патенты США № № 5739119 и 5759829). Кроме того, примеры антисмыслового ингибирования были продемонстрированы с ядерным белком циклином, геном множественной лекарственной устойчивости (MDR1), ICAM-1, E-селектином, STK-1, рецептором полосатого тела GABAA и человеческим EGF (см. Jaskulski et al., *Science*, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar et al., *Cancer Commun.*, 1:225-32 (1989); Penis et al., *Brain Res Mol Brain*

Res., 15; 57:310-20 (1998); и патенты США №№ 5801154, 5789573, 5718709 и 5610288). Более того, также были описаны антисмысловые конструкции, которые ингибируют и могут быть использованы для лечения различных аномальных клеточных пролифераций, например рака (см. патенты США №№ 5747470; 5591317; и 5783683). Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Способы получения антисмысловых олигонуклеотидов известны в данной области и могут быть легко адаптированы для получения антисмыслового олигонуклеотида, нацеленного на любую полинуклеотидную последовательность. Выбор антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей, специфичных для данной целевой последовательности, основан на анализе выбранной целевой последовательности и определении вторичной структуры, T_m , энергии связывания и относительной стабильности. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть выбраны на основании их относительной неспособности образовывать димеры, шпильки или другие вторичные структуры, которые могут снижать или ингибировать специфическое связывание с мРНК-мишенью в клетке-хозяине. Наиболее предпочтительные области-мишени мРНК включают области в кодоне инициации трансляции AUG или рядом с ним и те последовательности, которые практически комплементарны 5'-участкам мРНК. Эти вторичные структурные анализы и выбор целевого сайта могут быть выполнены, например, с использованием 4 версии программного обеспечения для анализа праймеров OLIGO (Molecular Biology Insights) и/или программного обеспечения алгоритма BLASTN 2.0.5. (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997)).

Рибозимы

Согласно другому варианту осуществления изобретения частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида связаны с рибозимами. Рибозимы представляют собой комплексы РНК-белок, имеющие специфические каталитические домены, обладающие эндонуклеазной активностью (см., Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:8788-92 (1987); и Forster et al., *Cell*, 49:211-20 (1987)). Например, большое количество рибозимов ускоряет реакции переноса фосфоэфира с высокой степенью специфичности, часто расщепляя только один из нескольких фосфоэфиров в олигонуклеотидном субстрате (см., Cech et al., *Cell*, 27:487-96 (1981); Michel et al., *J. Mol. Biol.*, 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek et al., *Nature*, 357:173-6 (1992)). Эта специфичность объясняется требованием, чтобы субстрат связывался посредством специфических взаимодействий спаривания оснований с внутренней направляющей последовательностью («IGS») рибозима до химической реакции.

В настоящее время известно по крайней мере шесть основных разновидностей природных ферментативных молекул РНК. Каждая из них может катализировать гидролиз транс-фосфодиэфирных связей РНК (и, таким образом, может расщеплять другие молекулы РНК) в физиологических условиях. Обычно ферментативные нуклеиновые кислоты сначала связываются с целевой РНК. Такое связывание происходит через

мишень-связывающую часть ферментативной нуклеиновой кислоты, которая удерживается в непосредственной близости от ферментной части молекулы, которая расщепляет целевую РНК. Таким образом, ферментативная нуклеиновая кислота сначала распознает, а затем связывает РНК-мишень посредством комплементарного спаривания оснований, а после связывания с правильным сайтом действует ферментативно, разрезая РНК-мишень. Стратегическое расщепление такой целевой РНК нарушает ее способность направлять синтез кодируемого белка. После того, как ферментативная нуклеиновая кислота связала и расщепила свою РНК-мишень, она высвобождается из этой РНК для поиска другой мишени и может многократно связываться и расщеплять новые мишени.

Ферментативная молекула нуклеиновой кислоты может быть получена, например, в форме головки молотка, шпильки, вируса гепатита δ , интрона группы I или РНКазы Р (в сочетании с направляющей последовательностью РНК) или мотива РНК *Neurospora VS*. Конкретные примеры мотивов в виде головки молотка описаны, например, в Rossi et al., *Nucleic Acids Res.*, 20:4559-65 (1992). Примеры мотивов в виде шпильки описаны, например, в EP 0360257, Hampel et al., *Biochemistry*, 28:4929-33 (1989); Hampel et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:299-304 (1990); и патент США № № 5631359. Пример мотива вируса гепатита δ описан, например, в Perrotta et al., *Biochemistry*, 31:11843-52 (1992). Пример мотива РНКазы Р описан, например, в Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35:849-57 (1983). Примеры рибозимного мотива РНК *Neurospora VS* описаны, например, в Saville et al., *Cell*, 61:685-96 (1990); Saville et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8826-30 (1991); Collins et al., *Biochemistry*, 32:2795-9 (1993). Пример интрона группы I описан, например, в патенте США № 4987071. Важными характеристиками ферментативных молекул нуклеиновых кислот, используемых в соответствии с изобретением, являются то, что они имеют специфический сайт связывания субстрата, который комплементарен одному или нескольким участкам ДНК или РНК целевого гена, и что они имеют нуклеотидные последовательности внутри или вокруг этого сайта связывания субстрата, которые придают молекуле активность расщепления РНК. Таким образом, конструкции рибозима не должны ограничиваться конкретными мотивами, упомянутыми в данном документе. Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Способы получения рибозима, нацеленного на любую полинуклеотидную последовательность, известны в данной области техники. Рибозимы можно конструировать, как описано, например, в публикациях РСТ №№ WO 93/23569 и WO 94/02595, и синтезировать для тестирования *in vitro* и/или *in vivo*, как описано в них. Сведения по данным РСТ публикациям, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Активность рибозима можно оптимизировать, изменяя длину связывающих плеч рибозима или химически синтезируя рибозимы с модификациями, которые предотвращают их разрушение под действием сывороточных рибонуклеаз (см., например, публикации РСТ № WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162 и WO 94/13688; EP

92110298.4; и патент США № 5334711, в которых описаны различные химические модификации, которые могут быть внесены в фрагменты сахара молекул ферментативной РНК, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей), модификации, которые повышают их эффективность в клетках, и удаление оснований ствола II для сокращения времени синтеза РНК и уменьшения химических требований.

Иммуностимулирующие олигонуклеотиды

Нуклеиновые кислоты, связанные с липидными частицами по данному изобретению, могут быть иммуностимулирующими, включая иммуностимулирующие олигонуклеотиды (ISS; одно- или двухцепочечные), способные вызывать иммунный ответ при введении субъекту, которым может быть млекопитающее, такое как человек. ISS включают, например, определенные палиндромы, ведущие к шпилькам вторичной структуры (см. Yamamoto et al., J. Immunol., 148:4072-6 (1992)) или мотивы CpG, а также другие известные особенности ISS (такие как мульти-G домены; см. публикацию РСТ № WO 96/11266, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей).

Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты считаются неспецифичными для последовательности, когда не требуется, чтобы они специфически связывались с целевой последовательностью и снижали ее экспрессию для того, чтобы вызвать иммунный ответ. Таким образом, некоторые иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты могут содержать последовательность, соответствующую области встречающегося в природе гена или мРНК, но они все же могут считаться иммуностимулирующими нуклеиновыми кислотами с неспецифичными последовательностями.

В одном варианте осуществления иммуностимулирующая нуклеиновая кислота или олигонуклеотид содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG. Олигонуклеотид или динуклеотид CpG может быть метилированным или метилированным. В другом варианте осуществления иммуностимулирующая нуклеиновая кислота включает по меньшей мере один динуклеотид CpG, содержащий метилированный цитозин. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота включает единственный динуклеотид CpG, где цитозин в динуклеотиде CpG метилирован. В альтернативном варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере два динуклеотида CpG, где по меньшей мере один цитозин в динуклеотидах CpG метилирован. В дополнительном варианте осуществления каждый цитозин в динуклеотидах CpG, присутствующих в последовательности, метилирован. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота включает множество динуклеотидов CpG, где по меньшей мере один из динуклеотидов CpG содержит метилированный цитозин. Примеры иммуностимулирующих олигонуклеотидов, подходящих для использования в композициях и способах по данному изобретению, описаны в заявке РСТ № РСТ/US08/88676, поданной 31 декабря 2008 г., публикациях РСТ №№ WO 02/069369 и WO 01/15726, патенте США № 6406705, и Raney et al., J. Pharm. Exper. Ther., 298:1185-92

(2001), описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, используемые в композициях и способах по данному изобретению, имеют фосфодизфирный («PO») каркас или фосфоротиоатный («PS») каркас и/или по меньшей мере один метилированный остаток цитозина в мотиве CpG.

мРНК

В определенных вариантах осуществления изобретения представлены композиции и способы, которые можно использовать для экспрессии одной или нескольких молекул мРНК в живой клетке (*например*, клетках в организме человека). Молекулы мРНК кодируют один или несколько полипептидов, экспрессируемых в живых клетках. В некоторых вариантах осуществления полипептиды экспрессируются в большом организме (*например*, млекопитающем, таком как человек), и экспрессия полипептида облегчает один или несколько симптомов заболевания. Композиции и способы по изобретению особенно полезны для лечения заболеваний человека, вызванных отсутствием или пониженными уровнями функционального полипептида в организме человека. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления LNP может содержать одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, таких как одна или несколько молекул мРНК (*например*, смесь молекул мРНК).

В некоторых вариантах осуществления мРНК полностью инкапсулированы в липидной частице нуклеиновой кислоты (*например*, LNP). Что касается композиций, содержащих смесь мРНК, различные типы видов мРНК, присутствующих в смеси (*например*, мРНК, имеющая разные последовательности), могут быть совместно инкапсулированы в одну и ту же частицу, или каждый тип видов мРНК, присутствующих в смеси, может быть инкапсулирован в отдельной частице. Смесь мРНК может быть составлена в виде частиц, описанных в данном документе, с использованием смеси двух или более отдельных мРНК (каждая из которых имеет уникальную последовательность) в идентичных, подобных или различных концентрациях или молярных соотношениях. В одном варианте осуществления смесь мРНК (соответствующий множеству мРНК с разными последовательностями) составлена с использованием идентичных, аналогичных или различных концентраций или молярных соотношений каждого вида мРНК, и разные типы мРНК совместно инкапсулируются в одной и той же частице. В другом варианте осуществления каждый тип видов мРНК, присутствующих в смеси, инкапсулирован в разные частицы при идентичных, аналогичных или различных концентрациях или молярных соотношениях мРНК, и частицы, образованные таким образом (каждая из которых содержит различную полезную нагрузку мРНК), вводят отдельно (*например*, в разное время в соответствии со схемой лечения), или их объединяют и вводят вместе в виде единичной стандартной дозы (*например*, с фармацевтически приемлемым носителем). Описанные в данном документе частицы являются стабильными в сыворотке крови, устойчивы к расщеплению нуклеазами и по существу нетоксичны для млекопитающих, таких как человек.

Модификации мРНК

мРНК, используемая на практике в настоящем изобретении, может включать одну, две или более двух нуклеозидных модификаций. В некоторых вариантах осуществления модифицированная мРНК демонстрирует пониженную деградацию в клетке, в которую введена мРНК, по сравнению с соответствующей немодифицированной мРНК.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают пиридин-4-онрибонуклеозид, 5-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин, 4-тиопсевдоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 5-гидроксиуридин, 3-метилуридин, 5-карбоксиметилуридин, 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-пропинилуридин, 1-пропинилпсевдоуридин, 5-тауринометилуридин, 1-тауринометилпсевдоуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин, 1-тауринометил-4-тиоуридин, 5-метилуридин, 1-метил-1-псевдоуридин, 4-тио-1-метил-1-псевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-псевдоуридин, 1-метил-1-1-дезапсевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезапсевдоуридин, дигидроуридин, дигидропсевдоуридин, 2-тиодигидроуридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метоксипсевдоуридин и 4-метокси-2-тиопсевдоуридин.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 5-азацитидин, псевдоизоцитидин, 3-метилцитидин, N4-ацетилцитидин, 5-формилцитидин, N4-метилцитидин, 5-гидроксиметилцитидин, 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин, 2-тио-5-метилцитидин, 4-тио-псевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, зебуларин, 5-азазебуларин, 5-метилзебуларин, 5-аза-2-тиозебуларин, 2-тиозебуларин, 2-метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метоксипсевдоизоцитидин и 4-метокси-1-метил-псевдоизоцитидин.

В других вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 7-дезааденин, 7-деза-8-азааденин, 7-деза-2-аминопурин, 7-деза-8-аза-2-аминопурин, 7-деза-2,6-диаминопурин, 7-деза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин, N6-метиладенозин, N6-изопентениладенозин, N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин, N6-глицинилкарбамоиладенозин, N6-треонилкарбамоиладенозин, 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин, N6,N6-диметиладенозин, 7-метиладенин, 2-метилтио-аденин и 2-метокси-аденин.

В конкретных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой 5'-0-(1-тиофосфат)-аденозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-цитидин, 5'-0-(1-тиофосфат)-гуанозин, 5'-0-(1-тиофосфат)-уридин или 5'-0-(1-тиофосфат)-псевдоуридин. α -тио-замещенный фосфатный фрагмент предназначен для придания стабильности РНК-полимерам за счет неестественных фосфоротиоатных связей основной цепи. Фосфоротиоатная РНК обладает повышенной устойчивостью к нуклеазам и, как следствие, более длительным периодом полужизни в клеточной среде. Ожидается, что нуклеиновые кислоты, связанные с фосфоротиоатом, также снижают врожденный

иммунный ответ за счет более слабого связывания/активации молекул врожденного иммунитета клетки.

В определенных вариантах осуществления желательно внутриклеточно разлагать модифицированную нуклеиновую кислоту, введенную в клетку, например, если требуется точное время продукции белка. Таким образом, в изобретении предложена модифицированная нуклеиновая кислота, содержащая домен деградации, на который можно направленно воздействовать внутри клетки.

В других вариантах осуществления модифицированные нуклеозиды включают инозин, 1-метилюнозин, виозин, вибутозин, 7-деаза-гуанозин, 7-деаза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-деаза-гуанозин, 6-тио-7-деаза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин, 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилюнозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин, N²-метилгуанозин, N²,N²-диметилгуанозин, 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N²-метил-6-тиогуанозин и N²,N²-диметил-6-тиогуанозин.

Необязательные компоненты модифицированных нуклеиновых кислот

В дополнительных вариантах осуществления модифицированные нуклеиновые кислоты могут содержать другие необязательные компоненты, которые могут быть полезными в некоторых вариантах осуществления. Эти необязательные компоненты включают, но не ограничиваются ими, нетранслируемые области, последовательности kozak, интронные нуклеотидные последовательности, участок внутренней посадки рибосомы (IRES), кэп и полиА-хвосты. Например, может быть предложена 5'-нетранслируемая область (UTR) и/или 3'-нетранслируемая область, где одна или обе могут независимо содержать одну или более различных модификаций нуклеозидов. В таких вариантах осуществления модификации нуклеозидов также могут присутствовать в транслируемой области. Также предложены нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность Kozak.

Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, содержащие одну или более интронных нуклеотидных последовательностей, которые могут быть вырезаны из нуклеиновой кислоты.

Нетранслируемые области (UTR)

Нетранслируемые области (UTR) гена транскрибируются, но не транслируются. 5'UTR начинается в сайте начала транскрипции и продолжается до иницирующего кодона, но не включает иницирующий кодон; тогда как 3'UTR начинается сразу после стоп-кодона и продолжается до сигнала терминации транскрипции. Появляется все больше доказательств регуляторной роли, которую играют UTR с точки зрения стабильности молекулы нуклеиновой кислоты и трансляции. Регуляторные свойства UTR могут быть включены в мРНК, используемую в данном изобретении, для повышения стабильности молекулы. Конкретные признаки также могут быть включены для обеспечения контролируемого подавления транскрипта в случае его неправильного направления на нежелательные участки органов.

5'-кэпирование

5'-кэп-структура мРНК задействована в ядерном экспорте, повышая стабильность мРНК и связывает кэп-связывающий белок (СВР) мРНК, который отвечает за стабильность мРНК в клетке и способность к трансляции за счет ассоциации СВР с поли(А) связывающим белком с образованием зрелых циклических видов мРНК. Кэп также способствует удалению 5'-проксимальных интронов в ходе сплайсинга мРНК.

Эндогенные молекулы мРНК могут иметь кэп на 5'-конце, образуя 5'-ppp-5'-трифосфатную связь между концевым остатком гуанозинового кэпа и 5'-концевым транскрибируемым смысловым нуклеотидом молекулы мРНК. Затем этот 5'-гуанилатный кэп может быть метилирован с образованием остатка N7-метилгуанилата. Сахара рибозы концевых и/или предконцевых транскрибируемых нуклеотидов 5'-конца мРНК могут необязательно также быть 2'-O-метилованными. 5'-декэпирование посредством гидролиза и расщепления структуры гуанилатного кэпа может нацеливаться на молекулу нуклеиновой кислоты, такую как молекула мРНК, для деградации.

Последовательности IRES

мРНК, содержащая участок внутренней посадки рибосомы (IRES), также можно использовать при практической реализации данного изобретения. IRES может действовать как единственный сайт связывания рибосомы или может служить одним из множества сайтов связывания рибосомы мРНК. мРНК, содержащая более одного функционального сайта связывания рибосомы, может кодировать более пептидов или полипептидов, которые независимо транслируются рибосомами («мультицистронная мРНК»). Если мРНК снабжена IRES, дополнительно необязательно предоставляется вторая транслируемая область. Примеры последовательностей IRES, которые можно использовать по изобретению, включают, без ограничения, последовательности из пикорнавирусов (например, ящура), вирусов вредителей (CFFV), вирусов полиомиелита (PV), вирусов энцефаломиокардита (ECMV), вирусов ящура (FMDV), вирусов гепатита С (HCV), вирусов классической чумы свиней (CSFV), вируса лейкемии мышей (MLV), вирусов обезьяньего иммунодефицита (SIV) или вирусов паралича свертка (CrPV).

Поли(А)-хвосты

В ходе процессинга РНК длинная цепь адениновых нуклеотидов (поли(А)-хвост) может быть добавлена к полинуклеотиду, такому как молекулы мРНК, для повышения стабильности. Сразу после транскрипции 3'-конец транскрипта может быть расщеплен для освобождения 3'-гидроксила. Затем поли(А)-полимераза добавляет к РНК цепь адениновых нуклеотидов. Процесс, называемый полиаденилированием, добавляет поли-А-хвост, который может иметь длину от 100 до 250 остатков.

Как правило, длина поли(А)-хвоста превышает 30 нуклеотидов. В другом варианте осуществления поли(А)-хвост имеет длину более 35 нуклеотидов (например, по меньшей мере или более около 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500 и 3000 нуклеотидов).

В этом контексте поли(А)-хвост может быть на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% больше по длине, чем модифицированная мРНК. Поли(А)-хвост может быть также сконструирован в качестве части модифицированной нуклеиновой кислоты, которой он принадлежит. В этом контексте поли(А)-хвост может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% или более от общей длины модифицированной мРНК или общей длины модифицированной мРНК минус поли-А-хвост.

Получение молекул мРНК

Способы выделения РНК, синтеза РНК, гибридизации нуклеиновых кислот, создания и скрининга библиотек кДНК и проведения ПЦР хорошо известны в данной области техники (см., например, Gubler and Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989)); как и методы ПЦР (см. патенты США №№ 4683195 и 4683202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)). Библиотеки экспрессируемых последовательностей также хорошо известны специалистам в данной области. Дополнительные основные тексты, раскрывающие общие способы применения данного изобретения, включают Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); и *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994). Сведения, сообщаемые по данным ссылкам, полностью включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Кодируемые полипептиды

Компонент мРНК частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида, описанной в данном документе, можно использовать для экспрессии представляющего интерес полипептида. Некоторые заболевания у людей вызваны отсутствием или нарушением функционального белка в клетках определенного типа, где этот белок обычно присутствует и активен. Функциональный белок может полностью или частично отсутствовать из-за, например, транскрипционной неактивности кодирующего гена или из-за наличия мутации в кодирующем гене, которая делает белок полностью или частично нефункциональным. Примеры заболеваний человека, которые вызваны полной или частичной инактивацией белка, включают X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит (X-SCID) и адренолейкодистрофию (X-ALD). X-SCID вызывается одной или более мутациями в гене, кодирующем общую гамма-цепь белка, который является компонентом рецепторов для нескольких интерлейкинов, которые участвуют в развитии и созревании В- и Т-клеток в иммунной системе. X-ALD вызывается одной или более мутациями в гене белка-переносчика пероксисомальной мембраны, называемого ABCD1. Люди, страдающие X-ALD, имеют очень высокий уровень длинноцепочечных жирных кислот в тканях по всему телу, что вызывает множество симптомов, которые могут привести к умственным расстройствам или смерти.

Были предприняты попытки использовать генную терапию для лечения некоторых заболеваний, вызванных отсутствием или нарушением функционального белка в клетках определенного типа, где этот белок обычно присутствует и активен. Генная терапия обычно включает введение вектора, который включает ген, кодирующий

функциональную форму пораженного белка, больному человеку и экспрессию функционального белка для лечения заболевания. До сих пор генная терапия имела ограниченный успех. Кроме того, некоторые аспекты доставки мРНК с использованием LNP были описаны, например, в международных публикациях WO 2018/006052 и WO 2015/011633.

Таким образом, существует постоянная потребность в улучшении экспрессии функциональной формы белка в организме человека, который страдает заболеванием, вызванным полным или частичным отсутствием функционального белка, и существует потребность в улучшенной доставке нуклеиновых кислот (например, мРНК) с помощью способов и композиций, *например*, которые могут вызывать меньший иммунный ответ на терапию. В этом контексте применимы определенные варианты осуществления данного изобретения. Таким образом, в определенных вариантах осуществления экспрессия полипептида облегчает один или более симптомов заболевания или расстройства. Определенные композиции и способы по изобретению могут быть полезны для лечения заболеваний человека, вызванных отсутствием или пониженными уровнями функционального полипептида в организме человека. В других вариантах осуществления определенные композиции и способы по изобретению могут быть полезны для экспрессии вакцинного антигена для лечения рака.

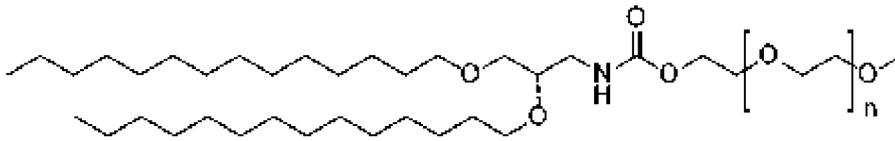
Самоамплифицирующаяся РНК

В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой одну или более молекул самоамплифицирующейся РНК. Самоамплифицирующаяся РНК (саРНК) также может называться самореплицирующейся РНК, репликационно-компетентной РНК, репликанами или RepRNA. RepRNA, называемая самоамплифицирующейся мРНК, когда происходит от вирусов с положительной цепью, генерируется из вирусного генома, лишённого по крайней мере одного структурного гена; он может транслироваться и реплицироваться (следовательно, «самоусиливаться») без образования инфекционного потомства вируса. В определенных вариантах осуществления технология RepRNA может использоваться для вставки генной кассеты, кодирующей желаемый интересующий антиген. Например, геном альфавируса разделен на две открытые рамки считывания (ORF): первая ORF кодирует белки для РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы), а вторая ORF кодирует структурные белки. В конструкции вакцины на основе саРНК ORF, кодирующая структурные белки вируса, может быть заменена любым антигеном по выбору, в то время как вирусная репликаза остается неотъемлемой частью вакцины и запускает внутриклеточную амплификацию РНК после иммунизации.

ПЭГ-С-DMA

Обычный специалист в данной области поймет, что концентрация ПЭГ-С-DMA может варьироваться в зависимости от скорости, с которой частица на основе нуклеиновой кислоты и липида должна становиться фузогенной. Например, скорость, с которой нуклеиновая кислота-липидная частица становится фузогенной, может быть

изменена, например, путем изменения молекулярной массы ПЭГ. В конкретном варианте осуществления ПЭГ-С-DMA имеет следующую структуру:



где n выбрано таким образом, чтобы полученная полимерная цепь имела молекулярную массу от около 1000 до около 3000. В другом варианте осуществления n выбрано таким образом, чтобы полученная полимерная цепь имела молекулярную массу около 2000. ПЭГ-С-DMA может быть получен, как описано Heyes et al, "Synthesis and Characterization of Novel Poly (Ethylene Glycol)-lipid Conjugates Suitable for use in Drug Delivery," *Journal of Controlled Release*, 2006, и в патенте США № 8936942.

Получение липидных частиц

В определенных вариантах осуществления данного изобретения предложена LNP, полученная с помощью способа непрерывного перемешивания, например процесса, который включает обеспечение водного раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, в первом резервуаре, обеспечение раствора органического липида во втором резервуаре и смешивание водного раствора с раствором органического липида таким образом, чтобы раствор органического липида смешивался с водным раствором, чтобы практически мгновенно получить липосомы, инкапсулирующие нуклеиновую кислоту (например, интерферирующую РНК или мРНК). Этот процесс и устройство для его осуществления подробно описаны в публикации патента США № 20040142025, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Непрерывное введение липидных и буферных растворов в среду для смешивания, например в камеру для смешивания, вызывает непрерывное разбавление липидного раствора буферным раствором, тем самым практически мгновенно образуя липосомы после смешивания. Используемое в данном документе выражение «непрерывное разбавление липидного раствора буферным раствором» (и варианты) обычно означает, что липидный раствор разбавляется достаточно быстро в процессе гидратации с достаточной силой, чтобы вызвать образование везикул. Путем смешивания водного раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, с раствором органического липида, раствор органического липида подвергается непрерывному ступенчатому разбавлению в присутствии буферного раствора (то есть водного раствора) с получением частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида.

LNP, сформированные с использованием способа непрерывного перемешивания, обычно имеют средний размер от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм или от около 70 нм до около 90 нм. Образованные таким образом частицы не агрегируются и необязательно имеют размер для достижения однородного размера частиц.

В другом варианте осуществления данного изобретения предложены LNP, полученные посредством процесса прямого разбавления, который включает

формирование раствора липосом и немедленное и прямое введение раствора липосом в сосуд для сбора, содержащий контролируемое количество буфера для разбавления. В предпочтительных аспектах сосуд для сбора содержит один или более элементов, сконфигурированных для перемешивания содержимого сосуда для сбора для облегчения разбавления. В одном аспекте количество буфера для разведения, присутствующего в сосуде для сбора, практически равно объему введенного в него раствора липосом. В качестве неограничивающего примера, раствор липосом в 45% этаноле при введении в сосуд для сбора, содержащий равный объем буфера для разбавления, будет преимущественно давать более мелкие частицы.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения предложены LNP, полученные посредством процесса прямого разбавления, в котором третий резервуар, содержащий буфер для разбавления, соединен по текучей среде со второй зоной смешивания. В этом варианте осуществления раствор липосом, образованный в первой зоне смешивания, сразу и непосредственно смешивается с буфером для разбавления во второй зоне смешивания. В предпочтительных аспектах вторая зона смешивания содержит T-образный соединитель, расположенный так, что потоки раствора липосом и буферного раствора для разбавления встречаются как противоположные потоки под углом 180° ; однако можно использовать соединители, обеспечивающие меньшие углы, например, от около 27° до около 180° . Насосный механизм подает регулируемый поток буфера во вторую зону смешивания. В одном аспекте осуществления скорость потока буфера для разбавления, подаваемого во вторую зону смешивания, регулируется так, чтобы она была практически равной скорости потока раствора липосом, вводимого в нее из первой зоны смешивания. Этот вариант осуществления преимущественно позволяет лучше контролировать поток смешивания буфера для разбавления с раствором липосом во второй зоне смешивания и, следовательно, также концентрацию раствора липосом в буфере на протяжении всего процесса второго смешивания. Такой контроль скорости потока буфера для разбавления позволяет преимущественно образовывать частицы малого размера при пониженных концентрациях.

Этот процесс и устройство для его осуществления подробно описаны в публикации патента США № 20070042031, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

LNP, сформированные с использованием способа прямого разбавления, обычно имеют средний размер от около 40 нм до около 150 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 60 нм до около 130 нм, от около 70 нм до около 110 нм или от около 70 нм до около 90 нм. Образованные таким образом частицы не агрегируются и необязательно имеют размер для достижения однородного размера частиц.

Если необходимо, липидные частицы по изобретению (например, LNP) могут быть измерены любым из способов, доступных для определения размера липосом. Распределение по размерам можно проводить для достижения желаемого диапазона размеров и относительно узкого распределения частиц по размерам.

Доступно более способов для получения частиц желаемого размера. Один способ получения нужных размеров, используемый для липосом и в равной степени применимый к настоящим частицам, описан в патенте США № 4737323, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Обработка суспензии частиц ультразвуком с помощью бани или зонда приводит к постепенному уменьшению размера частиц до размера менее около 50 нм. Гомогенизация - это еще один способ, основанный на энергии сдвига для дробления более крупных частиц на более мелкие. В стандартной процедуре гомогенизации частицы рециркулируют через стандартный гомогенизатор эмульсии до тех пор, пока не будут соблюдены выбранные размеры частиц, обычно от около 60 до около 80 нм. В обоих способах распределение частиц по размерам можно контролировать с помощью обычного распознавания размеров частиц с помощью лазерного луча или QELS.

Экструзия частиц через поликарбонатную мембрану с небольшими порами или асимметричную керамическую мембрану также является эффективным методом уменьшения размеров частиц до относительно четко определенного распределения по размерам. Обычно суспензию пропускают через мембрану один или более раз до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое распределение частиц по размеру. Частицы могут быть экструдированы через мембраны с последовательно уменьшающимися порами для достижения постепенного уменьшения размера.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в LNP предварительно конденсированы, как описано, например, в заявке на патент США № 09/744103, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

В других вариантах осуществления способы дополнительно включают добавление нелипидных поликатионов, которые полезны для осуществления липофекции клеток с использованием настоящих композиций. Примеры подходящих нелипидных поликатионов включают гексадиметринбромид (продается под торговой маркой POLYBRENE® от Aldrich Chemical Co., Милуоки, Висконсин, США) или другие соли гексадиметрина. Другие подходящие поликатионы включают, например, соли поли-L-орнитина, поли-L-аргинина, поли-L-лизина, поли-D-лизина, полиаллиламина и полиэтиленimina. Добавление этих солей предпочтительно после образования частиц.

Введение липидных частиц

После образования липидные частицы по изобретению (например, LNP) можно использовать для введения нуклеиновых кислот в клетки. Соответственно, настоящее изобретение также обеспечивает способы введения нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота (например, интерферирующей РНК или мРНК), в клетку. Способы осуществляются *in vitro* или *in vivo*, сначала формируя частицы, как описано выше, а затем приводя в контакт частицы с клетками в течение периода времени, достаточного для доставки нуклеиновой кислоты к клеткам.

Липидные частицы по изобретению (например, LNP) могут адсорбироваться практически на любом типе клеток, с которыми они смешаны или контактируют. После адсорбции частицы могут подвергаться эндоцитозу частью клеток, обмениваться липидами с клеточными мембранами или сливаться с клетками. Перенос или включение части нуклеиновой кислоты (например, нуклеиновой кислоты) частицы может происходить посредством любого из этих путей. В частности, когда происходит слияние, мембрана частицы интегрируется в клеточную мембрану, и содержимое частицы объединяется с внутриклеточной жидкостью.

Липидные частицы по изобретению (например, LNP) можно вводить либо по отдельности, либо в смеси с фармацевтически приемлемым носителем (например, физиологический раствор или фосфатным буфером), выбранным в соответствии со способом введения и стандартной фармацевтической практикой. Обычно в качестве фармацевтически приемлемого носителя используют обычный забуференный физиологический раствор (например, 135-150 мМ NaCl). Другие подходящие носители включают, например, воду, забуференную воду, 0,4% физиологический раствор, 0,3% глицин и т.п., включая гликопротеины для повышенной стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. Дополнительные подходящие носители описаны, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985). Используемый в данном документе термин «носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и тому подобное. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным веществам и композициям, которые при введении в организм человека не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию.

Фармацевтически приемлемый носитель обычно добавляют после образования частиц. Таким образом, после образования частицы ее можно разбавить фармацевтически приемлемыми носителями, такими как обычный забуференный физиологический раствор.

Концентрация частиц в фармацевтических препаратах может широко варьироваться, то есть от менее около 0,05%, обычно от около или по меньшей мере около от 2 до 5%, до около от 10 до 90 мас.%, и будет выбираться в первую очередь по объему жидкости, вязкости и т.д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Например, концентрация может быть увеличена для снижения нагрузки жидкости, связанной с лечением. Это может быть особенно желательно у пациентов, страдающих застойной сердечной недостаточностью, связанной с атеросклерозом или тяжелой гипертензией. В качестве альтернативы частицы, состоящие из раздражающих липидов, могут быть разбавлены до низких концентраций, чтобы уменьшить воспаление в месте введения.

Фармацевтические композиции по данному изобретению можно стерилизовать общепринятыми, хорошо известными методами стерилизации. Водные растворы могут

быть упакованы для применения или фильтровать в асептических условиях и лиофилизировать, при этом лиофилизированный препарат перед введением объединяют со стерильным водным раствором. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, регулирующие тоничность агенты и тому подобное, например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия и хлорид кальция. Кроме того, суспензия частиц может содержать липид-защитные агенты, которые защищают липиды от свободных радикалов и липид-перекисного окисления при хранении. Пригодны липофильные гасители свободных радикалов, такие как альфатокоферол и водорастворимые железоспецифичные хелатирующие агенты, такие как ферриоксамин.

Введение in vivo

Системная доставка для терапии in vivo, например доставка терапевтической нуклеиновой кислоты к дистальной клетке-мишени через системы организма, такие как кровообращение, была достигнута с использованием частиц на основе нуклеиновой кислоты и липида, таких как те, что описаны в публикациях РСТ № WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 и WO 04/002453, описания которых полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. В данном изобретении также предложены полностью инкапсулированные липидные частицы, которые защищают нуклеиновую кислоту от расщепления нуклеазой в сыворотке, являются неиммуногенными, имеют небольшой размер и подходят для повторного дозирования.

При введении in vivo введение может быть любым способом, известным в данной области, например, путем инъекции, перорального введения, ингаляции (например, интраназально или интратрахеально), трансдермального применения или ректального введения. Введение может осуществляться однократной или разделенной дозой. Фармацевтические композиции можно вводить парентерально, т.е. внутрисуставно, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, подкожно или внутримышечно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводятся внутривенно или внутривнутрибрюшинно с помощью болюсной инъекции (см., например, патент США № 5286634). Внутриклеточная кислота доставка нуклеиновой также была обсуждена в Straubinger et al., *Methods Enzymol.*, 101:512 (1983); Mannino et al., *Biotechniques*, 6:682 (1988); Nicolau et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6:239 (1989); and Behr, *Acc. Chem. Res.*, 26:274 (1993). Еще другие способы введения терапевтических средств на основе липидов описаны, например, в патентах США №№ 3993754, 4145410, 4235871, 4224179, 4,522,803 и 4588578. Липидные частицы можно вводить путем прямой инъекции в очаг заболевания или путем инъекции в участок, удаленный от очага заболевания (см., например, Culver, *HUMAN GENE THERAPY*, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. pp. 70-71 (1994)). Раскрытия указанных выше ссылок полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Композиции по данному изобретению, отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, могут быть превращены в аэрозольные препараты (т.е. они могут быть «распылены») для введения посредством ингаляции (например, интраназально или интратрахеально) (см., Brigham et al., Am. J. Sci., 298:278 (1989)). Аэрозольные составы могут быть помещены в подходящие пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот, и т.п.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции могут доставляться посредством интраназальных спреев, ингаляций и/или других средств доставки аэрозоля. Способы доставки композиций нуклеиновых кислот непосредственно в легкие через аэрозоли для назального введения описаны, например, в патенте США №№ 5756353 и 5804212. Аналогичным образом, доставка лекарств с использованием смол с микрочастицами для интраназального введения и соединений лизофосфатидилглицерина (патент США № 5725871) также хорошо известна в фармацевтике. Точно так же трансмукозальная доставка лекарственного средства в форме политетрафторэтиленовой матрицы описана в пат. США № 5780045. Раскрытия указанных выше патентов полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Составы, подходящие для парентерального введения, такого как, например, внутрисуставным (в суставы), внутривенным, внутримышечным, внутрикожным, внутрибрюшинным и подкожным путями, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. На практике данного изобретения композиции предпочтительно вводят, например, путем внутривенной инфузии, перорально, местно, внутрибрюшинно, внутрипузырно или интратекально.

Обычно при внутривенном введении составы липидных частиц составляют с подходящим фармацевтическим носителем. Многие фармацевтически приемлемые носители можно использовать в композициях и способах по данному изобретению. Подходящие составы для использования в данном изобретении можно найти, например, в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985). Могут использоваться различные водные носители, например вода, забуференная вода, 0,4% физиологический раствор, 0,3% глицин и т.п., и они могут содержать гликопротеины для повышения стабильности, такие как альбумин, липопротеин, глобулин и т.д. Обычно в качестве фармацевтически приемлемого носителя используется нормальный забуференный физиологический раствор (135-150 мМ NaCl), но других подходящих носителей будет достаточно. Эти композиции можно стерилизовать обычными методами липосомальной стерилизации, такими как фильтрация. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регуляторы pH и буферные

агенты, агенты, регулирующие тоничность, смачивающие средства и т.п., например, ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и т. д. Эти композиции можно стерилизовать с использованием способов, упомянутых выше, или, в качестве альтернативы, они могут быть получены в стерильных условиях. Полученные водные растворы могут быть упакованы для применения или отфильтрованы в асептических условиях и лиофилизированы, причем лиофилизированный состав объединяют со стерильным водным раствором перед введением.

В определенных применениях описанные в данном документе липидные частицы могут быть доставлены индивиду путем перорального введения. Частицы могут быть соединены с наполнителями и использоваться в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, пилюль, пастилок, эликсиров, жидкости для полоскания рта, суспензий, спреев для полости рта, сиропов, облаток и т.п. (см., например, патенты США №№ 5641515, 5580579 и 5792451, описания которых полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей). Эти пероральные лекарственные формы могут также содержать следующее: связующие вещества, желатин; вспомогательные вещества, смазывающие вещества и/или ароматизаторы. Когда единичная дозированная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов описанных выше, жидкий носитель. Разнообразные другие материалы могут присутствовать в виде покрытий или могут иным образом модифицировать физическую форму дозированной единицы. Конечно, любой материал, используемый при приготовлении любой единичной дозированной формы, должен быть фармацевтически чистым и по существу нетоксичным в используемых количествах.

Как правило, эти пероральные составы могут содержать, по меньшей мере, около 0,1% липидных частиц или более, хотя процентное содержание частиц может, конечно, варьироваться и обычно может составлять от около 1% или 2% до около 60% или 70% или более от веса или объема всей композиции. Естественно, количество частиц в каждой терапевтически полезной композиции может быть получено таким образом, чтобы подходящая дозировка была получена в любой данной стандартной дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические особенности, будут учтены специалистом в данной области при приготовлении таких фармацевтических составов, и поэтому могут быть желательны различные дозировки и режимы лечения.

Лекарственные формы, подходящие для перорального введения, могут состоять из: (а) жидких растворов, таких как эффективное количество упакованного терапевтического средства, такого как нуклеиновая кислота (например, интерферирующая РНК или мРНК), суспендированных в разбавителях, таких как вода, физиологический раствор или ПЭГ 400; (b) капсул, саше или таблеток, каждая из которых содержит заранее определенное количество терапевтического средства, такого как нуклеиновая кислота (например,

интерферирующая РНК или мРНК), в виде жидкостей, твердых веществ, гранул или желатина; (с) суспензии в соответствующей жидкости; и (d) подходящих эмульсий. Таблеточные формы могут содержать один или более из следующих компонентов: лактоза, сахароза, маннит, сорбит, фосфаты кальция, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза, желатин, коллоидный диоксид кремния, тальк, стеарат магния, стеариновая кислота и другие вспомогательные вещества, красители, наполнители, связующие вещества, разбавители, буферные агенты, увлажняющие агенты, консерванты, ароматизаторы, красители, дезинтегрирующие агенты и фармацевтически совместимые носители. Пастилки могут содержать терапевтическое средство, такое как нуклеиновая кислота (например, интерферирующая РНК или мРНК) в ароматизаторе, например сахарозе, а также пастилки, содержащие терапевтическое средство в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и эмульсии камеди, гели и т.п., содержащие, помимо терапевтического средства, носители, известные в данной области техники.

В другом примере их применения липидные частицы могут быть включены в широкий диапазон лекарственных форм для местного применения. Например, суспензия, содержащая частицы на основе нуклеиновой кислоты и липида, такие как LNP, может быть составлена и введена в виде гелей, масел, эмульсий, кремов для местного применения, паст, мазей, лосьонов, пен, муссов и т.п.

При приготовлении фармацевтических препаратов липидных частиц по изобретению предпочтительно использовать количество частиц, которые были очищены для уменьшения или удаления пустых частиц или частиц с терапевтическими средствами, такими как нуклеиновая кислота, связанная с внешней поверхностью.

Способы по данному изобретению можно применять на различных хозяевах. Предпочтительные хозяева включают виды млекопитающих, такие как приматы (например, люди и шимпанзе, а также другие нечеловекообразные приматы), собаки, кошки, лошади, коровы, овцы, козы, грызуны (например, крысы и мыши), зайцеобразные и свиньи.

Количество вводимых частиц будет зависеть от соотношения терапевтического средства (например, нуклеиновой кислоты) к липиду, конкретного используемого терапевтического средства (например, нуклеиновой кислоты), заболевания или расстройства, которое лечат, возраста, веса и состояния пациента. пациенту и оценки врача, но обычно составляет от около 0,01 до около 50 мг на килограмм веса тела, предпочтительно от около 0,1 до около 5 мг/кг веса тела, или около 10^8 - 10^{10} частиц на введение (например, инъекцию).

Введение *in vitro*

Для применений *in vitro* доставка терапевтических средств, таких как нуклеиновые кислоты (например, интерферирующая РНК или мРНК), может осуществляться в любую клетку, выращиваемую в культуре, независимо от того, происходит ли она из растений или животных, позвоночных или беспозвоночных, а также любой ткани или типа. В

предпочтительных вариантах осуществления клетки представляют собой клетки животных, более предпочтительно клетки млекопитающих и наиболее предпочтительно клетки человека.

Контакт между клетками и липидными частицами, когда он осуществляется *in vitro*, происходит в биологически совместимой среде. Концентрация частиц широко варьируется в зависимости от конкретного применения, но обычно составляет от около 1 мкмоль до около 10 ммоль. Обработку клеток липидными частицами обычно проводят при физиологических температурах (около 37 °С) в течение периодов времени от около 1 до 48 часов, предпочтительно от около 2 до 4 часов.

В одной группе предпочтительных вариантов осуществления суспензию липидных частиц добавляют к 60-80% конфлюэнтных клеток на планшете, имеющих плотность клеток от около 10^3 до около 10^5 клеток/мл, более предпочтительно около 2×10^4 клеток/мл. Концентрация суспензии, добавляемой к клеткам, предпочтительно составляет около от 0,01 до 0,2 мкг/мл, более предпочтительно около 0,1 мкг/мл.

Используя анализ параметров высвобождения эндосом (ERP), можно оптимизировать эффективность доставки LNP или другой липидной частицы по данному изобретению. Анализ ERP подробно описан в публикации патента США № 20030077829, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Более конкретно, цель анализа ERP состоит в том, чтобы различить действие различных катионных липидов и вспомогательных липидных компонентов LNP на основании их относительного влияния на связывание/захват или слияние с/дестабилизацию эндосомальной мембраны. Этот анализ позволяет количественно определить, как каждый компонент LNP или другой липидной частицы влияет на эффективность доставки, тем самым оптимизируя LNP или другую липидную частицу. Обычно анализ ERP измеряет экспрессию репортерного белка (например, люциферазы, β -галактозидазы, зеленого флуоресцентного белка (GFP) и т. д.), и в некоторых случаях состав LNP, оптимизированный для экспрессионной плазмиды, также будет подходящим для инкапсулирования интерферирующей РНК или мРНК. В других случаях анализ ERP может быть адаптирован для измерения подавления транскрипции или трансляции целевой последовательности в присутствии или в отсутствие интерферирующей РНК (например, миРНК). В других случаях анализ ERP может быть адаптирован для измерения экспрессии целевого белка в присутствии или в отсутствие мРНК. Сравнивая ERP для каждой из различных LNP или других липидных частиц, можно легко определить оптимизированную систему, например, LNP или другую липидную частицу, которая имеет наибольшее поглощение в клетке.

Клетки для доставки липидных частиц

Композиции и способы по данному изобретению используются для лечения широкого разнообразия типов клеток *in vivo* и *in vitro*. Подходящие клетки включают, например, гемопоэтические клетки-предшественники (стволовые), фибробласты, кератиноциты, гепатоциты, эндотелиальные клетки, скелетные и гладкомышечные клетки,

остеобласты, нейроны, покоящиеся лимфоциты, терминально дифференцированные клетки, медленные или нециклирующие первичные клетки, паренхимные клетки, лимфоидные клетки, эпителиальные клетки, костные клетки и т.п. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, такая как одна или более молекул нуклеиновой кислоты (например, интерферирующей РНК (например, миРНК) или мРНК), доставляется в раковые клетки, такие как, например, раковые клетки легких, раковые клетки толстой кишки, раковые клетки прямой кишки, раковые клетки анального канала, раковые клетки желчных протоков, раковые клетки тонкой кишки, раковые клетки желудка, раковые клетки пищевода, раковые клетки желчного пузыря, раковые клетки печени, раковые клетки поджелудочной железы, раковые клетки аппендикса, раковые клетки молочной железы, раковые клетки яичников, раковые клетки шейки матки, раковые клетки простаты, раковые клетки почек, раковые клетки центральной нервной системы, опухолевые клетки глиобластомы, раковые клетки кожи, клетки лимфомы, опухолевые клетки хориокарциномы, раковые клетки головы и шеи, опухолевые клетки остеогенной саркомы и раковые клетки крови.

Доставка *in vivo* липидных частиц, таких как LNP, инкапсулирующих одну или более молекул нуклеиновых кислот (например, интерферирующую РНК (например, миРНК) или мРНК), подходит для нацеливания на клетки любого типа. Способы и композиции могут быть использованы с клетками самых разных позвоночных, включая млекопитающих, таких как, например, собачьих, кошачьих, лошадей, крупного рогатого скота, овец, коз, грызунов (например, мышей, крыс и морских свинок), зайцеобразных, свиньи и приматы (например, обезьяны, шимпанзе и человека).

В той степени, в которой может потребоваться тканевая культура клеток, это хорошо известно в данной области. Например, Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3rd Ed., Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler et al., *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977), и ссылки, цитируемые в нем, представляют собой общее руководство по культуре клеток. Системы культивируемых клеток часто представляют собой монослои клеток, хотя также используются клеточные суспензии.

Обнаружение липидных частиц

В некоторых вариантах осуществления липидные частицы по данному изобретению (например, LNP) обнаруживаются у субъекта примерно через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более часов. В других вариантах осуществления липидные частицы по данному изобретению (например, LNP) обнаруживаются у субъекта примерно через 8, 12, 24, 48, 60, 72 или 96 часов, или примерно через 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25 или 28 дней после введения частиц. Присутствие частиц можно обнаружить в клетках, тканях или других биологических образцах субъекта. Частицы могут быть обнаружены, например, путем прямого обнаружения частиц, обнаружения терапевтической нуклеиновой кислоты, такой как последовательность интерферирующей РНК (например, миРНК) или последовательность мРНК, обнаружения целевой последовательности, представляющей

интерес (например, путем обнаружения изменения в экспрессии представляющей интерес последовательности) или их комбинацию.

Обнаружение частиц

Липидные частицы по изобретению, такие как LNP, могут быть обнаружены с помощью любого метода, известного в данной области техники. Например, метка может быть прямо или опосредованно связана с компонентом липидной частицы с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Можно использовать самые разные метки, причем выбор метки зависит от требуемой чувствительности, легкости конъюгации с компонентом липидных частиц, требований к стабильности, а также доступных инструментов и положений по утилизации. Подходящие метки включают, но не ограничиваются ими, спектральные метки, такие как флуоресцентные красители (например, флуоресцеин и производные, такие как флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и Oregon Green™; родамин и производные, такие как Texas red, тетрародимина изотиоцианат (TRITC) и др., дигоксигенин, биотин, фикоэритрин, AMCA, CyDyes™ и тому подобное; радиоактивные метки, такие как ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P и т.д.; ферменты, такие как пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и т.д.; спектральные колориметрические метки, такие как коллоидное золото или цветные стеклянные или пластиковые шарики, такие как полистирол, полипропилен, латекс и т.д. Метку можно обнаружить с помощью любых средств, известных в данной области техники.

Обнаружение нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты (например, интерферирующая РНК или мРНК) обнаруживаются и количественно определяются в данном документе любым из ряда способов, хорошо известных специалистам в данной области техники. Обнаружение нуклеиновых кислот может осуществляться хорошо известными методами, такими как саузерн-блоттинг, нозерн-блоттинг, гель-электрофорез, ПЦР, радиоактивное мечение, счет сцинтилляций и аффинная хроматография. Также могут быть использованы дополнительные аналитические биохимические методы, такие как спектрофотометрия, радиография, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ) и гипердиффузионная хроматография.

Выбор характера гибридизации нуклеиновой кислоты не имеет решающего значения. Специалистам в данной области известны различные характеры гибридизации нуклеиновых кислот. Например, общие характеры включают сэндвич-анализы и анализы конкуренции или вытеснения. Способы гибридизации в целом описаны, например, в, “Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach,” Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985).

Чувствительность гибридизационных анализов можно повысить за счет использования системы амплификации нуклеиновых кислот, которая умножает детектируемую нуклеиновую кислоту-мишень. Известны способы амплификации *in vitro*,

подходящие для амплификации последовательностей для использования в качестве молекулярных зондов или для создания фрагментов нуклеиновых кислот для последующего субклонирования. Примеры способов, достаточных для руководства специалистами по таким способам амплификации *in vitro*, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (LCR), амплификацию Q β -репликазы и другие способы, опосредованные РНК-полимеразой (например, NASBATM) можно найти в Sambrook et al., *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); и Ausubel et al., *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2002); а также патенте США № 4683202; *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990), *C&EN* 36; *The Journal Of NIH Research*, 3:81 (1991); Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989); Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990); Lomell et al., *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren et al., *Science*, 241:1077 (1988); Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291 (1990); Wu and Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer et al., *Gene*, 89:117 (1990); и Sooknanan and Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995). Усовершенствованные способы клонирования нуклеиновых кислот, амплифицированных *in vitro*, описаны в патенте США № 5426039. Другие способы, описанные в данной области, представляют собой системы амплификации на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBATM, Cangene, Mississauga, Ontario) и системы Q β -репликазы. Эти системы можно использовать для прямой идентификации мутантов, в которых праймеры для ПЦР или LCR предназначены для удлинения или лигирования только при наличии выбранной последовательности. В качестве альтернативы, выбранные последовательности могут быть стандартно амплифицированы с использованием, например, неспецифических праймеров для ПЦР и амплифицированной целевой области, позже исследуемой на специфическую последовательность, указывающую на мутацию. Раскрытия указанных выше ссылок полностью включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Нуклеиновые кислоты для применения в качестве зондов, например, в способах амплификации *in vitro*, для применения в качестве генных зондов или в качестве компонентов ингибиторов, обычно синтезируются химически в соответствии с твердофазным триэфир фосфорамидитным способом, описанным в Beaucage et al., *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981), e.g., using an automated synthesizer, as described in Needham VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984). При необходимости очистку полинуклеотидов обычно проводят либо электрофорезом в нативном акриламидном геле, либо с помощью анионообменной ВЭЖХ, как описано в Pearson et al., *J. Chrom.*, 255:137 149 (1983). Последовательность синтетических полинуклеотидов может быть проверена с использованием способа химической деградации Maxam и Gilbert (1980), описанном в Grossman and Moldave (eds.) Academic Press, New York, *Methods in Enzymology*, 65:499.

Альтернативным способом определения уровня транскрипции является гибридизация *in situ*. Анализы гибридизации *in situ* хорошо известны и в целом описаны в Angerer et al., *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987). В анализе гибридизации *in situ* клетки фиксируют на твердой подложке, обычно на предметном стекле. Если нужно зондировать ДНК, клетки денатурируют нагреванием или щелочью. Затем клетки контактируют с раствором для гибридизации при умеренной температуре, чтобы обеспечить возможность отжига определенных меченых зондов. Зонды предпочтительно метят радиоизотопами или флуоресцентными метками.

Примеры

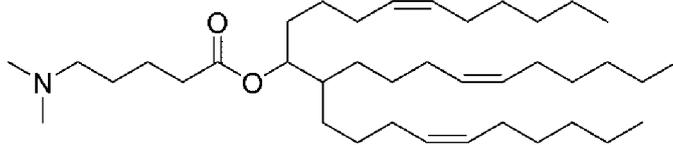
Настоящее изобретение будет более подробно описано с помощью конкретных примеров. Следующие примеры ниже предлагаются для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения изобретения. Специалисты в данной области техники легко распознают ряд некритических параметров, которые можно изменить или модифицировать с получением практически идентичных результатов.

Примеры

Пример 1

Иллюстративная липидная композиция по изобретению показана в следующей таблице, в которой:

CL₁ представляет собой



или его соль.

Иллюстративные липидные композиции

Пример	Композиция	Молярные соотношения
1	ПЭГ-C-DMA:CL1:CHOL:DSPC	1,5: 50,0: 38,5: 10,0

Композицию готовили с использованием следующей процедуры.

Готовили исходные липиды (общее содержание липидов около 7 мг/мл) в 100% этаноле с использованием описанных липидных характеристик и молярных соотношений. мРНК разбавляли ацетатом с pH 5 и водой без нуклеаз, для достижения концентрации мРНК 0,366 мг/мл в 100 мМ ацетате с pH 5. Равные объемы каждого раствора смешивали со скоростью 400 мл/мин в Т-образном соединителе и разбавляли около 4 объемами ЗФР, pH 7,4, используя метод прямого разбавления, описанный в патенте США № 9404127. Затем составы помещали в установки для диализа Slide-A-Lyzer (MWCO 10000) и диализовали в течение ночи 10 мМ Трис, 500 мМ NaCl с pH 8 (буфер Трис/NaCl). После диализа составы упаривали до около 0,6 мг/мл с использованием концентраторов VivaSpin (MWCO 100000), а затем фильтровали через 0,2 мкм шприцевой фильтр.

Пример 2 Анализ *in vivo*

Обычно LNP вводили внутривенно в дозе 0,5 мг/кг самкам мышей линии Balb/C в

возрасте 5-8 недель, и кровь собирали через 4-6 часов после введения дозы; кровь собирали в K2EDTA и выделяли плазму, затем хранили замороженным виде при -80°C до проведения анализа. Активность оценивали путем тестирования плазмы на экспрессию человеческого ЭПО с использованием набора для ИФА человеческого ЭПО либо от StemCell (номер за каталогом 01630), либо от R&D Systems (номер за каталогом DEP00) в соответствии с инструкциями производителя. Данные представлены в следующей таблице.

Как видно из данных в таблице 1, композиция по настоящему изобретению значительно более эффективна, чем композиция МСЗ, используемая в патисиране (Onpattro), одобренном продукте LNP для лечения TTR амилоидоза.

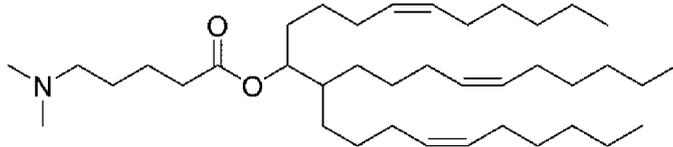
Таблица 1. Эффективность липидной композиции 1 0,5 мг/кг и композиции на основе патисирана, содержащей мРНК ЭПО человека, через 4 часа после внутривенного введения мышам Balb/C (n=4)

Липидная композиция	ЭПО (мЕд/мл)	Станд. откл. (мЕд/мл)
Липидная композиция 1 с CL1 (1,5 : 50,0: 38,5: 10.0)	136439	17373
Композиция на основе патисирана с МСЗ (1,5 : 50,0: 38,5: 10.0)	42230	2697

Следует понимать, что приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения. Многие варианты осуществления станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения приведенного выше описания. Следовательно, объем изобретения должен быть определен не со ссылкой на вышеприведенное описание, а вместо этого должен быть определен со ссылкой на прилагаемую формулу изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые имеет право такая формула изобретения. Раскрытия всех статей и ссылок, включая заявки на патенты, патенты, публикации PCT и номера доступа Genbank, включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Липидная наночастица, содержащая:
 - (a) одну или более молекул нуклеиновой кислоты;
 - (b) холестерин;
 - (c) DSPC;
 - (d) ПЭГ-С-DMA; и
 - (e) катионный липид формулы:



или ее соль, где молярный процент от общего липида для ПЭГ-С-DMA, катионного липида, холестерина и DSPC является следующим:

ПЭГ-С-DMA: около 1,5;
 катионные липиды: около 50,0;
 холестерин: около 38,5; и
 DSPC: около 10,0.

2. Липидная наночастица по п. 1, в которой одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты содержат мРНК.
3. Липидная наночастица по п. 1, в которой одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты содержат мРНК.
4. Липидная наночастица по любому из пп. 1-3, имеющая массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота) более чем около 17.
5. Липидная наночастица по любому из пп. 1-3, имеющая массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота) более чем около 18.
6. Липидная наночастица по любому из пп. 1-3, имеющая массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота) более чем около 19.
7. Липидная наночастица по любому из пп. 1-3, имеющая массовое соотношение (общий липид):(нуклеиновая кислота) от около 22 до около 25.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая липидную наночастицу по любому из пп. 1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.
9. Фармацевтическая композиция по п. 8, составленная для подкожного введения.
10. Способ доставки нуклеиновой кислоты в клетку, включающий приведение клетки в контакт с липидной наночастицей по любому из пп. 1-7.
11. Способ лечения заболевания, характеризующегося генетическим нарушением, которое приводит к дефициту функционального белка, включающий: введение субъекту с заболеванием липидной наночастицы по любому из пп. 1-7, при этом молекула нуклеиновой кислоты представляет собой мРНК, кодирующую функциональный белок или белок, обладающий такой же биологической активностью, что и функциональный белок.

12.Способ лечения заболевания, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида, включающий введение субъекту с заболеванием липидной наночастицы по любому из пп. 1-7, при этом молекула нуклеиновой кислоты представляет собой миРНК, которая нацелена на экспрессию сверхэкспрессируемого полипептида.

13.Липидная наночастица по любому из пп. 1-7 для терапевтического или профилактического лечения заболевания, характеризующегося генетическим нарушением, которое приводит к дефициту функционального белка.

14.Липидная наночастица по любому из пп. 1-7 для терапевтического или профилактического лечения заболевания, характеризующегося сверхэкспрессией полипептида.

По доверенности