

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290495 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.01

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.07

(54) ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕТИДЫ, ТАРГЕТИРУЮЩИЕ
SNP

(31) 62/885,066; 62/976,168

(32) 2019.08.09; 2020.02.13

(33) US

(86) PCT/US2020/045487

(87) WO 2021/030213 2021.02.18

(71) Заявитель:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАССАЧУСЕТС
(US)

(72) Изобретатель:

Хворова Анастасия, Альтерман
Джулия, Контрой Фейт, Пфистер
Эдит, Аронин Нейл, Ямада Кен (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены новые олигонуклеотиды, которые усиливают подавление экспрессии гена, содержащего однонуклеотидный полиморфизм (SNP), по сравнению с экспрессией соответствующего гена дикого типа. Предложены способы использования новых олигонуклеотидов, которые усиливают подавление экспрессии гена, содержащего SNP, по сравнению с экспрессией соответствующего гена дикого типа.

202290495
A1

202290495

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573212EA/026

ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕТИДЫ, ТАРГЕТИРУЮЩИЕ SNP

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/885,066, поданной 9 августа 2019 г., и предварительной заявки на патент США № 62/976,168, поданной 13 февраля 2020 г. Полное содержание заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ О ФЕДЕРАЛЬНО СПОНСИРУЕМОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Это изобретение было осуществлено при государственной поддержке в рамках грантов № NS104022 и G M108803, присужденных National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

РНК-интерференция представляет собой простой и эффективный инструмент для ингибирования функции генов. Агенты сайленсинга РНК вызвали особый интерес в качестве инструментов исследования и терапевтических агентов из-за их способности подавлять экспрессию определенного белка с высокой степенью специфичности последовательности. Специфичность последовательности агентов сайленсинга РНК особенно полезна для лечения заболеваний, вызванных доминантными мутациями в гетерозиготах, несущих одну мутантную и одну дикого типа копию определенного гена. Однако остается потребность в агентах сайленсинга РНК, которые могут преимущественно подавлять экспрессию мутантных, вызывающих заболевание аллелей, при отсутствии (или лишь минимальном) влиянии на экспрессию аллеля дикого типа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее раскрытие основано, по крайней мере частично, на неожиданном открытии новых олигонуклеотидов, которые усиливают сайленсинг экспрессии гена, содержащего однонуклеотидный полиморфизм (SNP) (например, гетерозиготный SNP) по сравнению с экспрессией соответствующего гена дикого типа в гетерозиготе, например, более чем в 100 раз. В некоторых аспектах, представлен олигонуклеотид (например, дсРНК (dsRNA)), который предпочтительно таргетирует нуклеиновую кислоту, содержащую SNP, для деградации, где олигонуклеотид (например, двухцепочечная РНК (дсРНК)) не таргетирует или таргетирует в меньшей степени, соответствующую нуклеиновую кислоту дикого типа (не содержащую SNP) для деградации. В некоторых аспектах, олигонуклеотид (например, дсРНК) по настоящему изобретению является: 1) комплементарным положению SNP в нуклеиновой кислоте-мишени; и 2) содержит нарушение комплементарности в конкретном положении нуклеиновой кислоты-мишени относительно SNP. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид (например, дсРНК) содержит два нарушения комплементарности относительно соответствующей последовательности нуклеиновой кислоты-мишени дикого типа: 1) в положении SNP

дикого типа; и 2) в конкретном положении последовательности нуклеиновой кислоты-мишени относительно положения SNP дикого типа. Соответственно, типовой олигонуклеотид (например, дсРНК) содержит одно нарушение комплементарности по отношению к SNP-содержащей мишени и два нарушения комплементарности по отношению к соответствующей последовательности дикого типа, что приводит к предпочтительному расщеплению SNP-содержащей мишени по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа.

В одном аспекте нуклеиновая кислота, имеющая 5' конец, 3' конец и область узнавания мишени, которая комплементарна области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP комплементарен аллельному полиморфизму, положение нарушения комплементарности (MM), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене, и, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (X) с каждой стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый X расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления каждый X расположен в пределах четырех нуклеотидов от нуклеотида положения SNP. В некоторых вариантах осуществления каждый X расположен в пределах трех нуклеотидов от нуклеотида положения SNP. В некоторых вариантах осуществления, каждый X расположен в пределах двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, каждый X независимо содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метила (2'-OMe), 2'-фтора (2'-F), 2'-рибо, 2'- дезоксирибо, 2'-F-4'-тиоарабино (2'-F-ANA), 2'-О-(2-метоксиэтила) (2'-MOE), 4'-S-РНК, закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, 2'-О-цианозтил-РНК (CNet-РНК), трицикло-ДНК, циклогексенилнуклеиновой кислоты (CeNA), арабинонуклеиновой кислоты (ANA) и гекситнуклеиновой кислоты (HNA).

В некоторых типовых вариантах осуществления, X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP. В некоторых типовых вариантах осуществления, X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP присутствует в положении от 2 до 6 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 6 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 4 до 6 от 5' конца (например, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от

5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 5 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 5 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 4 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца или в положении 4 от 5' конца).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида положения SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 7 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 8 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 9 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 10 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В другом аспекте, представлена нуклеиновая кислота, имеющая 5' конец, 3' конец и область узнавания мишени, которая комплементарна области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотид в положении SNP в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP комплементарен аллельному полиморфизму, положение MM, которое не соответствует нуклеотиду в гене, и, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (Y) по обе

стороны от нуклеотида в положении MM, где каждый Y находится в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах четырех нуклеотидов от нуклеотида в положении MM. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах трех нуклеотидов от нуклеотида в положении MM. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

В некоторых вариантах осуществления, каждый Y независимо содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-OMe, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирибо, 2'-F-ANA, 2'-MOE, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-O-аллила, 2'-O-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA.

В некоторых вариантах осуществления, Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM. В некоторых типовых вариантах осуществления, Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 6 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 4 до 6 от 5' конца (например, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 5 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 5 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 4 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца или в положении 4 от 5' конца).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления,

положение ММ расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 7 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 8 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 9 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 10 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении ММ расположен на расстоянии от 2 до 6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение ММ расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В другом аспекте, представлена нуклеиновая кислота, имеющая 5' конец, 3' конец и область узнавания мишени, которая комплементарна области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотид в положении SNP в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP комплементарен аллельному полиморфизму, положение ММ, которое не соответствует нуклеотиду в гене, и, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (X) по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый X расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, и, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (Y) с каждой стороны от нуклеотида в положении ММ, где каждый Y расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от положения ММ нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, каждый X расположен в пределах четырех нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, каждый X расположен в пределах трех нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, каждый X расположен в пределах двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах четырех нуклеотидов от нуклеотида в положении ММ. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах трех нуклеотидов от нуклеотида в положении ММ. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y расположен в пределах двух нуклеотидов от нуклеотида в положении ММ.

В некоторых вариантах осуществления, каждый X независимо содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирибо, 2'-F-ANA, 2'-MOE, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-O-аллила, 2'-O-этиламина,

CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA. В некоторых вариантах осуществления, каждый Y независимо содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирibo, 2'-F-ANA, 2'-MOE, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA.

В некоторых типовых вариантах осуществления, X расположен непосредственно в 5' к нуклеотиду в положении SNP или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP. В некоторых типовых вариантах осуществления, X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM. В некоторых типовых вариантах осуществления, Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 6 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 4 до 6 от 5' конца (например, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца или в положении 6 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 5 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 3 до 5 от 5' конца (например, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца или в положении 5 от 5' конца). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 4 от 5' конца (например, в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца или в положении 4 от 5' конца).

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 7 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM

расположено в 8 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 9 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 10 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. Например, в некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 2 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 3 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 4 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 5 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. В некоторых вариантах осуществления, положение MM расположено в 6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых вариантах осуществления, X и Y являются одинаковыми.

В другом аспекте, нуклеиновая кислота, имеющая 5' конец и 3' конец, которые комплементарны области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотид в положении SNP, комплементарный аллельному полиморфизму, нуклеотид в положении MM, который не соответствует нуклеотиду в гене, по меньшей мере, один 2'-фтор-рибонуклеотид по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый 2'-фтор-рибонуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP и, по меньшей мере, один 2'-метоксирибонуклеотид по обе стороны от нуклеотида в положении MM, где каждый 2'-метоксирибонуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, или 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, и 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM, или 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM. В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM, и 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP присутствует в области узнавания мишени, и нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии от 2 до 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP (например, 2

нуклеотида от нуклеотида в положении SNP, 3 нуклеотида от нуклеотида в положении SNP, 4 нуклеотида от нуклеотида в положении SNP, 5 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, 6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, 7 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, 8 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, 9 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, 10 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP или 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP).

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца, и нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит три, четыре, пять или шесть 2'-фтор-рибонуклеотидов. В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота содержит три, четыре, пять или шесть 2'-метоксирибонуклеотидов.

В другом аспекте, представлена нуклеиновая кислота, имеющая 5' конец и 3' конец, комплементарный области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где нуклеиновая кислота содержит нуклеотид в положении SNP, комплементарный аллельному полиморфизму, MM положение нуклеотида, которое не совпадает с нуклеотидом в гене, по меньшей мере, три 2'-фтор-рибонуклеотида, расположенных в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, и, по меньшей мере, три 2'-метоксирибонуклеотида, расположенных в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, или 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP. В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, и 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM, или 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM, и 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP присутствует в области узнавания мишени, и нуклеотид в положении MM расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца, и где нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

В еще одном аспекте, представлена молекула миРНК (siRNA), которая содержит

смысловую цепь, комплементарную гену-мишени, и антисмысловую цепь, комплементарную смысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит нуклеиновую кислоту в соответствии с любым из предыдущих аспектов или вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину от 13 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов до 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов (например, длину 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов).

В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь имеет длину от 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов до 22 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов (например, длину 18, 19, 20, 21 или 22 нуклеотида или нуклеотидных аналога).

В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В еще одном аспекте, представлен разветвленный олигонуклеотид, содержащий две или несколько молекул миРНК, ковалентно связанных друг с другом, где каждая молекула миРНК независимо представляет собой молекулу миРНК по любому из предыдущих аспектов или вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления, разветвленный олигонуклеотид содержит две молекулы миРНК, ковалентно связанные друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления, молекулы миРНК ковалентно связаны друг с другом посредством линкера.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеупомянутые и другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания типовых вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми чертежами. Файл патента или заявки содержит, по меньшей мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации патентной заявки с цветным(и) чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и за уплату необходимой пошлины.

ФИГ. 1 показывает репортерные плазмиды psiCHECK, содержащие либо область дикого типа htt, либо такую же область htt с SNP, rs362273.

ФИГ. 2 показывает гистограмму, показывающую активность люциферазы после анализа репортерной плазмиды psiCHECK в клетках HeLa, трансфицированных hsiРНК с нуклеотидом SNP в различных положениях. Этот первичный скрининг дал множество эффективных гидрофобно модифицированных последовательностей миРНК (hsiРНК).

ФИГ. 3 показывает кривые доза-ответ, показывающие эффект сайленсинга трех типовых hsiРНК на репортерных плаزمидях psiCHECK.

ФИГ. 4 показывает кривую доза-ответ, показывающую эффективность двух hsiРНК в отношении сайленсинга htt мРНК.

ФИГ. 5 показывает гистограммы, показывающие активность люциферазы после анализа репортерной плазмиды psiCHECK в клетках HeLa, трансфицированных hsiPHK, имеющими второе нарушение комплементарности в различных положениях.

ФИГ. 6 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга hsiPHK SNP2 с (mm2-7) или без (mm2-0) дополнительного нарушения комплементарности.

ФИГ. 7 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга SNP4 hsiPHK с или без нарушения комплементарности.

ФИГ. 8 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга SNP6 hsiPHK с или без нарушения комплементарности.

ФИГ. 9 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга SNP4 или SNP6 hsiPHK с дополнительным нарушением комплементарности (SNP4-7 и SNP6-11, соответственно) по сравнению с теми же hsiPHK без дополнительного нарушения комплементарности (SNP4-0 и SNP4-11). Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, обратно трансфицировали hsiPHK путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Экспрессию репортера измеряли с помощью двойного анализа люциферазы.

ФИГ. 10 показывает кривые доза-ответ экспрессии htt мРНК, которые измеряют эффективность сайленсинга активности hsiPHK с дополнительными нарушениями комплементарности.

ФИГ. 11 схематически показывает hsiPHK и иллюстративные модификации в соответствии с некоторыми вариантами осуществления.

ФИГ. 12А - ФИГ. 12С показывают библиотеки SNP2, SNP4 и SNP6 hsiPHK, соответственно. Антисмысловые цепи изображены от 5' до 3', сайт SNP показан красным, и нарушение комплементарности показаны синим.

ФИГ. 13 показывает последовательности антисмысловых и смысловых цепей и модели модификаций для различных конструкций hsiPHK в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. mm4-7 и mm6-11 продемонстрировали превосходную дискриминацию SNP и были отобраны для дальнейшего скрининга.

ФИГ. 14 показывает типовое SNP-селективное соединение, сконструированное как ди-миРНК.

ФИГ. 15 показывает скелетные связи согласно некоторым типовым вариантам осуществления. Олигонуклеотидные скелеты могут содержать одну или любую комбинацию фосфатов, фосфоротиоатов (рацемическую смесь или стереоспецифическую), дифосфотиоатов, фосфорамидатов, пептидных нуклеиновых кислот (PNA), боранофосфатов, 2'-5'-фосфодиэфиров, амидов, фосфоацетатов, морфолино и подобных.

ФИГ. 16 показывает модификации сахара в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления. Модификации сахара включают одну или любую комбинацию 2'-О-метила, 2'-фтора, 2'-рибо, 2'-дезоксирибо, 2'-F-ANA, MOE, 4'-S-РНК,

LNA, 4'-S-F-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA, HNA и подобные.

ФИГ. 17 показывает межнуклеотидные связи в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления. Потенциальные межнуклеотидные связи могут быть между первыми двумя нуклеотидами на 5' или 3' концах любой заданной цепи олигонуклеотида, которые могут быть стабилизированы любой из изображенных групп.

ФИГ. 18 показывает модификации стабилизации 5' согласно некоторым типовым вариантам осуществления. Подходящей модификацией стабилизации 5' может быть фосфат, отсутствие фосфата, винилфосфонат, C5-метил (R или S или рацемический), C5-метил на виниле, восстановленный винил (например, трехуглеродный алкил) или подобные.

ФИГ. 19 показывает группы конъюгатов в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления. Подходящей конъюгированной группой может быть алкильная цепь любой длины, витамин, лиганд, пептид или биоактивный конъюгат, например, гликофинголипид, полиненасыщенная жирная кислота, секостероид, стероидный гормон, стероидный липид и подобные.

ФИГ. 20 графически показывает, что активность SNP дискриминирующего каркаса, который содержит нуклеотид в положении SNP в положении 6 от 5' конца и нуклеотид в положении нарушения комплементарности, расположенный в положении 11 от 5' конца, не зависит от последовательности.

ФИГ. 21 показывает типовой синтез описанной здесь межсубъединичной связи, модифицированной винилфосфонатом (VP).

ФИГ. 22 показывает способ получения олигонуклеотидов, имеющих VP-модифицированную межсубъединичную связь.

ФИГ. 23 показывает графическое изображение VP-модифицированной РНК, в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления.

ФИГ. 24 показывает последовательности VP-модифицированных олигонуклеотидов, синтезированных в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления.

ФИГ. 25 показывает резюме сравнительного исследования эффективности миРНК.

ФИГ. 26 показывает схему антисмысловых каркасов hsiРНК, выровненных с последовательностью НТТ, окружающей сайт SNP rs362273, где зеленым прямоугольником показано положение сайта SNP.

ФИГ. 27А и 27В показывает эффект добавления нарушения комплементарности в последовательности миРНК улучшает дискриминацию аллелей, не нарушая сайленсинг мутантного аллеля.

ФИГ. 28А и 28В показывает VP-модифицированные последовательности, полученные с помощью синтезатора.

ФИГ. 29 показывает другой способ получения VP-модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе.

ФИГ. 30 показывает эффект, который VP-модифицированная связь оказывает на дискриминацию мишени/не мишени SNP-селективных миРНК.

ФИГ. 31 показывает пример химического каркаса ди-разветвленной миРНК.

ФИГ. 32А показывает вестерн-блоттинг, выполненный для измерения уровней белка НТТ. **ФИГ. 32В** показывает уровни белка, нормализованные по отношению к винкулину.

ФИГ. 33 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга для олигонуклеотидов, таргетирующих G в сайте SNP вместо A.

ФИГ. 34 показывает типовые последовательности, вводящие единичные нарушения комплементарности в последовательности, ранее выбранной для получения кривой доза-ответ.

ФИГ. 35 показывает ряд типовых модификаций олигонуклеотидного остова.

ФИГ. 36 показывает мотивы ветвления олигонуклеотидов в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления. Двойные спирали представляют собой олигонуклеотиды. Комбинация различных линкеров, спейсеров и точек ветвления позволяет создавать большое разнообразие разветвленных структур hsiРНК.

ФИГ. 37 показывает типовые разветвленные олигонуклеотиды с конъюгированными биоактивными группами.

ФИГ. 38 показывает типовые амидитные линкеры, спейсеры и разветвляющие группы.

ФИГ. 39 показывает схему антисмысловых каркасов hsiРНК, выровненных с последовательностью НТТ, окружающих альтернативный сайт SNP rs362273.

ФИГ. 40 показывает гистограммы, показывающие активность люциферазы после анализа репортерной плазмиды psiCHECK в клетках HeLa, трансфицированных hsiРНК, показанными на **ФИГ. 39**. Число, следующее за «SNP», представляет положение SNP в миРНК.

ФИГ. 41 показывает кривые доза-ответ, сравнивающие эффекты сайленсинга на активность олигонуклеотидов, показанных на **ФИГ. 39**, таргетирующих C или T на сайте SNP3.

ФИГ. 42 показывает гистограммы, показывающие активность люциферазы после анализа репортерной плазмиды psiCHECK в клетках HeLa, трансфицированных hsiРНК, показанными на **ФИГ. 39**, которые были изменены, чтобы иметь второе нарушение комплементарности в разных положениях.

ФИГ. 43 показывает пример модифицированных межсубъединичных линкеров.

ФИГ. 44А показывает типовой пример получения мономера для модифицированных фосфинатсодержащих олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе. **ФИГ. 44В** показывает типовой пример получения другого мономера для модифицированных фосфинатсодержащих олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе. **ФИГ. 44С** показывает типовой пример получения модифицированных фосфинатсодержащих олигонуклеотидов, представленных

в настоящем документе.

ФИГ. 45 показывает типовые SNP в гене HTT (SEQ ID NO: 1-10 (нумерация сверху вниз)).

ФИГ. 46 показывает блок-схему, иллюстрирующую методологию создания и выбора SNP-дискриминирующих миРНК.

ФИГ. 47 показывает соглашение о присвоении имен, обозначающих положение SNP внутри миРНК.

ФИГ. 48А - ФИГ. 48D графически показывают эффективность и дискриминацию таргетного и не таргетного связывания и расщепления, опосредованного изменением содержания 2'-фтор/2'-метокси рядом с нуклеотидом в положении SNP и нуклеотидом в положении MM миРНК. **(А)** показывает результаты для различных вариантов SNP 6-11. **(В)** показывает результаты для 6-11 по сравнению с 6-11, имеющими модифицированный паттерн ffmff (четыре 2'-фтор-рибонуклеотида и 2'-метоксирибонуклеотид рядом с SNP в положении 6). **(С)** показывает результаты для 6-11 по сравнению с 6-11, имеющими модифицированный паттерн mmm11 (три 2'-метоксирибонуклеотида рядом с MM в положении 11). **(D)** показывает результаты для 6-11 по сравнению с 6-11, имеющими модифицированный паттерн fff6mmm11 (три 2'-фтор-рибонуклеотида рядом с SNP в положении 6 и три 2'-метоксирибонуклеотида рядом с MM в положении 11). Клетки HeLa трансфицировали одной из двух репортерных плазмид, обратно трансфицировали миРНК путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Экспрессию репортера измеряли с помощью анализа двойной люциферазы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим олигонуклеотиды, например, РНК, агенты сайленсинга, например, РНК, такие как двухцепочечные РНК («дсРНК», dsRNA), антисмысловые олигонуклеотиды («ASO») и подобные, которые применимы для сайленсинга аллельных полиморфизмов, расположенных внутри гена, кодирующего мутантный белок. В конкретном аспекте, олигонуклеотид, например, РНК, агент сайленсинга представляет собой агент дсРНК представленный в настоящем документе, который разрушает соответствующую мутантную мРНК (например, мРНК, содержащую SNP) с нуклеотидной специфичностью и селективностью. Олигонуклеотиды, например, РНК, агенты сайленсинга, например, агенты дсРНК, описанные в настоящем документе, таргетируют мРНК, соответствующую полиморфным областям мутантного гена, что приводит к расщеплению мутантной мРНК и предотвращению синтеза соответствующего мутантного белка, например, мутантного белка с усилением функции, например белка хантингтин.

Определения

Если в настоящем документе не указано иное, используемые в настоящем документе научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. В случае какой-либо скрытой двусмысленности приведенные в настоящем документе определения имеют приоритет над любым

словарным или внешним определением. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное число. Использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Использование термина «включающий», а также других форм, таких как «включает» и «включен», не является ограничивающим.

Используемый в настоящем документе в контексте олигонуклеотидных последовательностей «А» представляет собой нуклеозид, содержащий основание аденин (например, аденозин или его химически модифицированное производное), «G» представляет собой нуклеозид, содержащий основание гуанин (например, гуанозин или его химически модифицированное производное), «U» представляет собой нуклеозид, содержащий основание урацил (например, уридин или его химически модифицированное производное), и «C» представляет собой нуклеозид, содержащий основание аденин (например, цитидин или его химически модифицированное производное).

Используемый в настоящем документе термин «блокирующая группа» относится к химической группе, который заменяет атом водорода в функциональной группе, такой как спирт (ROH), карбоновая кислота (RCO₂H) или амин (RNH₂). Неограничивающие примеры блокирующих групп включают: алкил (например, метил, трет-бутил); алкенил (например, винил, аллил); карбоксил (например, ацетил, бензоил); карбамоил; фосфат; и фосфонат (например, винилфосфонат). Другие подходящие блокирующие группы известны специалистам в данной области техники.

Термин «нуклеотидный аналог», или «измененный нуклеотид», или «модифицированный нуклеотид» относится к нестандартному нуклеотиду, включая не встречающиеся в природе рибонуклеотиды или дезоксирибонуклеотиды. Типовые нуклеотидные аналоги модифицированы в любом положении так, чтобы изменить определенные химические свойства нуклеотида, но при этом сохранить способность нуклеотидного аналога выполнять предназначенную ему функцию. Примеры положений нуклеотида, которые могут быть дериватизированы, включают положение 5, например, 5-(2-амино)пропилирудин, 5-бромуридин, 5-пропинуридин, 5-пропенилирудин и подобные; положение 6, например, 6-(2-амино)пропилирудин; положение 8 для аденозина и/или гуанозинов, например, 8-бромгуанозин, 8-хлоргуанозин, 8-фторгуанозин и т.д. нуклеотидные аналоги также включают дезануклеотиды, например, 7-дезааденозин; О- и N-модифицированные (например, алкилированные, например, N⁶-метиладенозин или другие известные в данной области техники) нуклеотиды; и другие гетероциклически модифицированные нуклеотидные аналоги, такие как аналоги, описанные в Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000 Aug. 10(4):297-310.

Термин «олигонуклеотид» относится к короткому полимеру нуклеотидов и/или нуклеотидных аналогов. Термин «аналог РНК» относится к полинуклеотиду (например, химически синтезированному полинуклеотиду), имеющему, по меньшей мере, один измененный или модифицированный нуклеотид по сравнению с соответствующей неизменной или не модифицированной РНК, но сохраняющий такую же или

аналогичную природу или функцию, что и соответствующая неизменная или не модифицированная РНК. Как обсуждалось выше, олигонуклеотиды могут быть связаны связями, что приводит к более низкой скорости гидролиза аналога РНК по сравнению с молекулой РНК с фосфодиэфирными связями. Например, нуклеотиды аналога могут содержать метилндиольные, этилндиольные, оксиметилтио, оксиэтилтио, оксикарбонилокси, фосфородиамидатные, фосфорамидатные и/или фосфоротиоатные связи. В конкретных вариантах осуществления, аналоги РНК включают рибонуклеотиды и/или дезоксирибонуклеотиды с модифицированным сахаром и/или остовом. Такие изменения или модификации могут дополнительно включать добавление не нуклеотидного материала, например, на конец(и) РНК или внутрь (на один или несколько нуклеотидов РНК). Аналог РНК должен быть достаточно похож на природную РНК, чтобы иметь возможность опосредовать РНК интерференцию.

Используемые в настоящем документе, типовые олигонуклеотиды включают, но не ограничены ими, миРНК (siRNA), микроРНК (microRNA), кшРНК (shRNA), направляющие CRISPR, ДНК олигонуклеотиды, антисмысловые олигонуклеотиды, AAV олигонуклеотиды, гэлмеры, миксмеры, ингибиторы микроРНК, SSO, PMO, PNA и подобные.

Используемый в настоящем документе термин «РНК интерференция» («РНКи») относится к селективной внутриклеточной деградции РНК. РНКи естественным образом возникает в клетках для удаления чужеродных РНК (например, вирусных РНК). Природная РНКи протекает через группы, отщепленные от свободной дсРНК, которые направляют механизм деградции на другие подобные последовательности РНК. Альтернативно, РНКи может быть инициирована рукой человека, например, для сайленсинга экспрессии генов-мишеней.

Используемый в настоящем документе термин «hsiРНК» (hsiRNA) относится к варианту осуществления двухцепочечных РНК, представленных в настоящем документе, где молекула РНК полностью химически модифицирована, включая одну или несколько гидрофобных модификаций, как описано в настоящем документе.

Агент РНКи, например, агент сайленсинга РНК, имеющий цепь, которая является «последовательностью, достаточно комплементарной последовательности мРНК-мишени, чтобы направлять специфическую РНК-интерференцию (РНКи)», означает, что цепь имеет последовательность, достаточную для запуска разрушения РНКи мРНК-мишени с помощью механизма или процесса РНКи.

Используемый в настоящем документе термин «выделенная РНК» (например, «выделенная миРНК» или «выделенный предшественник миРНК») относится к молекулам РНК, которые по существу не содержат другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами, или по существу не содержат химические предшественники или другие химические вещества при химическом синтезе.

Используемый в настоящем документе термин «сайленсинг РНК» относится к группе сиквенс-специфичных регуляторных механизмов (например, РНК интерференции

(РНКи), транскрипционному сайленсингу гена (TGS), посттранскрипционному сайленсингу генов (PTGS), подавлению, ко-супрессии, трансляционной репрессии и подобным), опосредованных молекулами РНК, что приводит к ингибированию или «сайленсингу» экспрессии соответствующего гена, кодирующего белок. Сайленсинг РНК наблюдался у многих типов организмов, включая растения, животных и грибы.

Термин «дискриминационный сайленсинг РНК» относится к способности молекулы РНК по существу ингибировать экспрессию «первой» или «мишени» полинуклеотидной последовательности, не ингибируя по существу экспрессию «второй» или «вне мишени» полинуклеотидной последовательности, например, когда обе полинуклеотидные последовательности присутствуют в одной и той же клетке. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность-мишень соответствует гену-мишени, тогда как полинуклеотидная последовательность вне мишени соответствует гену вне мишени. В других вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность-мишень соответствует аллелю-мишени, тогда как полинуклеотидная последовательность вне мишени соответствует аллелю вне мишени. В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность-мишень представляет собой последовательность ДНК, кодирующую регуляторную область (например, элементы промотора или энхансера) гена-мишени. В других вариантах осуществления, полинуклеотидная последовательность-мишень представляет собой мРНК-мишень, кодируемую геном-мишенью.

Ген, «участвующий» в заболевании или нарушении, включает ген, нормальная или аберрантная экспрессия или функция которого влияет или вызывает заболевание или нарушение или, по меньшей мере, один симптом указанного заболевания или нарушения.

Используемый в настоящем документе термин «ген-мишень» (например, мутантный аллель гетерозиготного полиморфизма, например, гетерозиготный SNP) представляет собой ген, экспрессия которого должна быть существенно ингибирована или «выключена». Такой сайленсинг может быть достигнут путем выключения РНК, например, путем расщепления мРНК гена-мишени или репрессии трансляции гена-мишени. Термин «ген вне мишени» (например, аллель дикого типа) представляет собой ген, экспрессия которого не должна быть по существу выключена. В одном варианте осуществления, полинуклеотидные последовательности генов мишени и вне мишени (например, мРНК, кодируемая генами мишенями и вне мишеней) могут отличаться на один или несколько нуклеотидов. В другом варианте осуществления, гены-мишени и гены вне мишени могут отличаться одним или несколькими полиморфизмами (например, однонуклеотидные полиморфизмы или SNP). В другом варианте осуществления, гены-мишени и гены вне мишени могут иметь менее чем 100% идентичность последовательностей. В другом варианте осуществления, ген вне мишени может быть гомологом (например, ортологом или паралогом) гена-мишени.

«Аллель-мишень» представляет собой аллель (например, аллель SNP), экспрессия которого должна быть селективно ингибирована или «сайленсирована». Такой сайленсинг

может быть достигнут путем сайленсинга РНК, например, путем расщепления мРНК гена-мишени или аллеля-мишени с помощью миРНК. Термин «аллель вне мишени» представляет собой аллель (например, соответствующий аллель дикого типа), экспрессия которого не должна быть по существу исключена. В некоторых вариантах осуществления, аллели-мишени и вне мишени могут соответствовать одному и тому же гену-мишени. В других вариантах осуществления, аллель-мишень соответствует или ассоциирован с геном-мишенью, и аллель вне мишени соответствует или ассоциирован с геном вне мишени. В одном варианте осуществления, полинуклеотидные последовательности аллелей-мишеней и вне мишеней могут отличаться на один или несколько нуклеотидов. В другом варианте осуществления, аллели-мишени и вне мишеней могут отличаться одним или несколькими аллельными полиморфизмами (например, один или несколько SNP). В другом варианте осуществления, аллели-мишени и вне мишеней могут иметь менее чем 100% идентичность последовательностей.

Термин «полиморфизм», используемый в настоящем документе, относится к вариации (например, одной или нескольким делециям, вставкам или заменам) в последовательности гена, которая идентифицируется или обнаруживается, когда одна и та же последовательность гена из разных источников или субъектов (но из одного и того же организма) сравниваются. Например, полиморфизм может быть идентифицирован при сравнении одной и той же последовательности генов от разных субъектов. Идентификация таких полиморфизмов является рутинной в данной области техники, при этом методологии аналогичны тем, которые используются для обнаружения, например, точечных мутаций рака молочной железы. Идентификацию можно провести, например, по ДНК, выделенной из лимфоцитов субъекта, с последующей амплификацией полиморфных областей с использованием специфических праймеров к указанной полиморфной области. Альтернативно, полиморфизм можно идентифицировать при сравнении двух аллелей одного и того же гена.

В конкретных вариантах осуществления, полиморфизм представляет собой однонуклеотидный полиморфизм (SNP). Изменение последовательности между двумя аллелями одного и того же гена в организме называется в настоящем документе «аллельным полиморфизмом». В некоторых вариантах осуществления, аллельный полиморфизм соответствует аллелю SNP. Например, аллельный полиморфизм может включать однонуклеотидную вариацию между двумя аллелями SNP, также называемую в настоящем документе гетерозиготным SNP. Полиморфизм может быть в нуклеотиде в пределах кодирующей области, но из-за вырожденности генетического кода не кодируется изменение аминокислотной последовательности. Альтернативно, полиморфные последовательности могут кодировать другую аминокислоту в определенном положении, но изменение аминокислоты не влияет на функцию белка. Полиморфные области также могут быть обнаружены в не кодирующих областях гена. В конкретных вариантах осуществления, полиморфизм обнаружен в кодирующей области гена или в нетранслируемой области (например, 5' UTR или 3' UTR) гена.

Используемый в настоящем документе термин «частота аллелей» представляет собой меру (например, долю или процент) относительной частоты аллеля (например, аллеля SNP) в одном локусе в популяции особей. Например, если популяция особей несет n локусов определенного хромосомного локуса (и ген, занимающий локус) в каждой из своих соматических клеток, то аллельная частота аллеля представляет собой долю или процент локусов, которые аллель занимает в пределах популяции. В конкретных вариантах осуществления, аллельная частота аллеля (например, аллеля SNP) составляет, по меньшей мере, 10% (например, по меньшей мере, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или более) в образце популяции.

Термин «мутация с приобретением функции», используемый в данном документе, относится к любой мутации в гене, при которой белок, кодируемый указанным геном (т.е. мутантный белок), приобретает функцию, обычно не связанную с этим белком (т.е. белком дикого типа), которая вызывает или способствует возникновению заболевания или нарушения. Мутация с приобретением функции может быть делецией, добавлением или заменой нуклеотида или нуклеотидов в гене, что приводит к изменению функции кодируемого белка. В одном варианте осуществления, мутация с приобретением функции изменяет функцию мутантного белка или вызывает взаимодействие с другими белками. В другом варианте осуществления, мутация с приобретением функции вызывает уменьшение или удаление нормального белка дикого типа, например, путем взаимодействия измененного мутантного белка с указанным нормальным белком дикого типа.

Используемый в настоящем документе термин «нарушение с приобретением функции» относится к нарушению, характеризующемуся мутацией с приобретением функции. В одном варианте осуществления, нарушение с приобретением функции представляет собой нейродегенеративное заболевание, вызванное мутацией с приобретением функции, например, полиглутаминовые нарушения и/или заболевания с тринуклеотидными повторами, например болезнь Хантингтона. В другом варианте осуществления, нарушение с приобретением функции вызвано приобретением функции в онкогене, при этом мутантный генный продукт представляет собой мутант с приобретением функции, например, рак, вызванный мутацией в *ret* онкогене (например, *ret-1*), например, эндокринные опухоли, медуллярные опухоли щитовидной железы, опухоли паратиреоидного гормона, множественную эндокринную неоплазию типа 2 и подобные. Дополнительные типовые нарушения с приобретением функции включают, но не ограничены ими, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), иммунодефицитное заболевание человека (HIV) и врожденный миастенический синдром с медленными каналами (SCCMS).

Термин «заболевания с тринуклеотидными повторами», используемый в данном документе, относится к любому заболеванию или нарушению, характеризующемуся расширенной областью с тринуклеотидным повтором, расположенным внутри гена, при этом расширенная область с тринуклеотидным повтором является причиной заболевания

или нарушения. Примеры заболеваний с тринуклеотидными повторами включают, но не ограничены ими, спинозомжечковую атаксию типа 12, спинозомжечковую атаксию типа 8, синдром ломкой X-хромосомы, умственную отсталость с ломкой XE, атаксию Фридрейха и миотоническую дистрофию. Типовыми заболеваниями с тринуклеотидными повторами для лечения в соответствии с настоящим изобретением являются заболевания, характеризующиеся или вызываемые расширенной областью с тринуклеотидными повторами на 5' конце кодирующей области гена, гена, кодирующего мутантный белок, который вызывает или является причиной заболевания или нарушения. Некоторые тринуклеотидные заболевания, например, синдром ломкой X-хромосомы, при которых мутация не связана с кодирующей областью, могут быть непригодны для лечения в соответствии с методологиями настоящего описания, поскольку не существует подходящей мРНК, на которую может быть направлена РНКи. Напротив, такое заболевание, как атаксия Фридрейха, может подходить для лечения в соответствии с методологиями настоящего описания, потому что, хотя причинная мутация не находится в пределах кодирующей области (т. е. находится внутри интрона), мутация может находиться, например, внутри предшественника мРНК (например, предварительно подвергнутого сплайсингу предшественника мРНК).

Термин «полиглутаминовое нарушение», используемый в настоящем документе, относится к любому заболеванию или нарушению, характеризующемуся увеличенным числом $(CAG)_n$ повторов на 5' конце кодирующей области (таким образом, кодирующей увеличенную полиглутаминовую область в кодируемом белке). В одном варианте осуществления, полиглутаминовые нарушения характеризуются прогрессирующей дегенерацией нервных клеток. Примеры полиглутаминовых нарушений включают, но не ограничены ими, болезнь Хантингтона, спинозомжечковую атаксию типа 1, спинозомжечковую атаксию типа 2, спинозомжечковую атаксию типа 3 (также известную как болезнь Мачадо-Джозефа) и спинозомжечковую атаксию типа 6, спинозомжечковую атаксию типа 7, дентато-рубро-паллидо-люйсову атрофию и подобные.

Термин «нарушение однонуклеотидного полиморфизма» или «нарушение SNP» относится к нарушению, характеризующемуся наличием SNP, например, гетерозиготного SNP. Нарушения SNP включают, но не ограничены ими, фенилкетонурию, муковисцидоз, серповидноклеточную анемию, альбинизм, болезнь Хантингтона, миотоническую дистрофию 1 типа, гиперхолестеринемию (аутосомно-доминантную, типа В), нейрофиброматоз (тип 1), поликистозную болезнь почек (1 и 2), гемофилию А, мышечную дистрофию Дюшенна, X-сцепленный гипофосфатемический рахит, синдром Ретта, не обструктивную сперматогенную недостаточность и подобные. Типовым гетерозиготным нарушением SNP является болезнь Хантингтона.

В некоторых аспектах, предложена двухцепочечная РНК (дсРНК), содержащая первую цепь примерно из 15-35 нуклеотидов, которая комплементарна области гена, содержащей аллельный полиморфизм, и вторую цепь примерно из 15-35 нуклеотидов, которая комплементарна, по меньшей мере, части первой цепи, где первая цепь содержит

нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении 2-7 от 5' конца, который является комплементарным аллельному полиморфизму; и нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), расположенный на расстоянии 2-11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене. В типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 2, 4 или 6 от 5' конца, и нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM) расположен на расстоянии 2-6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма» или «нуклеотид в положении SNP» относится к положению РНК, описанному в настоящем документе (например, первой цепи двухцепочечной РНК), которое соответствует полиморфному положению последовательности нуклеиновой кислоты-мишени (т.е. либо мутантному нуклеотиду, соответствующему аллелю SNP, либо нуклеотиду дикого типа, соответствующему аллелю дикого типа). Например, цепь может быть помечена как «SNP2», «SNP3» или «SNP4», чтобы обозначить положение SNP как 2, 3 или 4 нуклеотида от 5' конца цепи.

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в области узнавания мишени. В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP расположен между положением 2 и положением 7 от 5' конца, между положением 2 и положением 6 от 5' конца или между положением 2 и положением 5 от 5' конца. В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP расположен в положении 2 от 5' конца, в положении 3 от 5' конца, в положении 4 от 5' конца, в положении 5 от 5' конца, в положении 6 от 5' конца или в положении 7 от 5' конца описанной в настоящем документе РНК (например, первой цепи дсРНК). В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP расположен в положении, указанном в таблицах 5-7.

Используемый в настоящем документе термин «область узнавания мишени» относится к шестинуклеотидному удлинению, соответствующему положениям 2-7 от 5' конца цепи РНК. Считается, что распознавание мРНК мРНК-мишени обеспечивается областью узнавания мишени ее антисмысловой цепи.

Используемый в настоящем документе термин «нуклеотид в положении нарушения комплементарности» или «нуклеотид в положении MM» относится к положению РНК, описанному в настоящем документе (например, первой цепи двухцепочечной РНК), которое находится в положении, которое не соответствует положению нуклеотида SNP. Нуклеотид в положении MM можно определить по его положению от 5' конца или 3' конца описанной в настоящем документе РНК (например, 5' или 3' конца первой цепи дсРНК) или по его положению относительно нуклеотида в положении SNP РНК, описанной в настоящем документе (например, первой цепи двухцепочечной РНК).

В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии 2-11 нуклеотидов, 2-10 нуклеотидов, 2-9 нуклеотидов, 2-8

нуклеотидов, 2-7 нуклеотидов или 2-6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM расположен на расстоянии 11 нуклеотидов, 10 нуклеотидов, 9 нуклеотидов, 8 нуклеотидов, 7 нуклеотидов, 6 нуклеотидов, 5 нуклеотидов, 4 нуклеотидов, 3 нуклеотидов или 2 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP. В некоторых типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении MM находится в положении, указанном в таблицах 5-7.

В одном варианте осуществления, РНК, описанная в настоящем документе (например, первая цепь двухцепочечной РНК), гомологична аллельному полиморфизму, за исключением одного несовпадающего олигонуклеотида в конкретном положении относительно нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму. В некоторых вариантах осуществления, нарушение комплементарности находится в пределах примерно 6 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, в пределах примерно 5 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, в пределах примерно 4 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, в пределах примерно 3 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP, в пределах примерно 2 нуклеотидов в положении SNP или в пределах примерно 1 нуклеотида в положении SNP. В конкретных вариантах осуществления, нарушение комплементарности не находится рядом с нуклеотидом в положении SNP.

В другом варианте осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 2, 3, 4, 5 или 6 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 2 от 5' конца. В варианте осуществления, находится в положении 3 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 4 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 5 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 6 от 5' конца.

В некоторых типовых вариантах осуществления, РНК, описанная в настоящем документе (например, первая цепь двухцепочечной РНК), содержит нуклеотид в положении MM в положении 5, 7, 8, 11, 14, 15 или 16 от 5' конца. В некоторых типовых вариантах осуществления, РНК, описанная в настоящем документе (например, первая цепь двухцепочечной РНК), содержит нуклеотид в положении MM 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 или 11 нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, РНК, описанная в настоящем документе (например, первая цепь двухцепочечной РНК), содержит комбинацию нуклеотида в положении SNP (обозначается от 5' конца) и нуклеотида в положении MM (обозначается от 5' конца), выбранную из группы, состоящей из 2-7, 4-7, 4-8, 4-15, 6-5, 6-8, 6-11, 6-14, 6-16, 3-5, 3-7 и 3-8.

В конкретном типовом варианте осуществления, описанная в настоящем документе РНК (например, первая цепь двухцепочечной РНК) содержит нуклеотид в положении SNP в положении 6 от 5' конца и нуклеотид в положении MM в положении 11 от 5' конца. В другом конкретном типовом варианте осуществления, описанная в настоящем документе

РНК (например, первая цепь двухцепочечной РНК) содержит нуклеотид в положении SNP в положении 4 от 5' конца и нарушение комплементарности в положении 7 от 5' конца.

В одном аспекте, двухцепочечные РНК, представленные в настоящем документе, селективно подавляют мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм. В одном варианте осуществления, двухцепочечные РНК, представленные в настоящем документе, выключают мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и не влияют на аллель дикого типа того же гена. В другом варианте осуществления, двухцепочечные РНК, представленные в настоящем документе, выключают мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и выключают аллель дикого типа того же гена в меньшей степени, чем мутантный аллель.

Соответственно, в одном аспекте, настоящее изобретение представляет способ лечения субъекта, страдающего или подверженного риску заболевания, характеризующегося или вызываемого мутантным белком, ассоциированным с аллельным полиморфизмом, путем введения субъекту эффективного количества агента РНК интерференции, таргетирующего аллельный полиморфизм в гене, кодирующем мутантный белок (например, белок хантингтин), так, что происходит интерференция, специфичная к последовательности гена, что приводит к эффективному лечению заболевания.

В одном аспекте, агенты сайленсинга РНК, описанные в настоящем документе, предпочтительно выключают мутантный аллель, содержащий полиморфизм, более эффективно, чем соответствующий аллель дикого типа. В некоторых типовых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе дсРНК выключают аллель, содержащий полиморфизм на примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90% больше, чем соответствующий аллель дикого типа. В одном варианте осуществления, агенты, сайленсинга РНК, описанные в настоящем документе, выключают аллель, содержащий полиморфизм, по меньшей мере, примерно на 50% больше, чем соответствующий аллель дикого типа. В некоторых типовых вариантах осуществления, дсРНК, описанные в настоящем документе, выключают аллель, содержащий полиморфизм, по меньшей мере, примерно в 5 раз, примерно в 10 раз, примерно в 15 раз, примерно в 20 раз, примерно в 25 раз, примерно в 30 раз, примерно в 35 раз, примерно в 40 раз, примерно в 45 раз, примерно в 50 раз, примерно в 55 раз, примерно в 60 раз, примерно в 65 раз, примерно в 70 раз, примерно в 75 раз, примерно в 80 раз, примерно в 85 раз, примерно в 90 раз, примерно в 95 раз, примерно в 100 раз, примерно в 110 раз, примерно в 120 раз, примерно в 130 раз, примерно в 140 раз, примерно в 150 раз, примерно в 160 раз, примерно в 170 раз, примерно в 180 раз, примерно в 190 раз, примерно в 200 раз, примерно в 250 раз, примерно в 300 раз, примерно в 350 раз, примерно в 400 раз, примерно в 450 раз или примерно в 500 раз выше уровня сайленсинга соответствующего аллеля дикого типа.

Используемый в настоящем документе термин «антисмысловая цепь» агента сайленсинга РНК, например, агента сайленсинга РНК или миРНК, относится к цепи,

которая по существу комплементарна участку примерно из 10-50 нуклеотидов, например, примерно 15-30, 16-25, 18-23 или 19-22 нуклеотида мРНК гена, таргетированного для сайленсинга. Антисмысловая цепь или первая цепь имеет последовательность, достаточно комплементарную желаемой последовательности мРНК-мишени, чтобы направлять мишень-специфический сайленсинг, например, комплементарность, достаточную для запуска разрушения желаемой мРНК-мишени механизмом или процессом РНКи (РНКи интерференцией), или комплементарность, достаточную для запуска трансляционной репрессии желаемой мРНК-мишени.

Термин «смысловая цепь» или «вторая цепь» агента сайленсинга РНК, например агента сайленсинга миРНК или РНК, относится к цепи, комплементарной антисмысловой цепи или первой цепи. Антисмысловые и смысловые цепи также могут называться первой или второй цепями, где первая или вторая цепь комплементарна последовательности-мишени, и соответствующая вторая или первая цепь комплементарна указанной первой или второй цепи. Промежуточные соединения дуплекса миРНК или дуплексов, подобных миРНК, включают цепь миРНК, имеющую достаточную комплементарность участку примерно из 10-50 нуклеотидов мРНК гена, таргетированного для сайленсинга, и цепь миРНК*, имеющую достаточную комплементарность для образования дуплекса с цепью миРНК.

Используемый в настоящем документе термин «антисмысловый олигонуклеотид» или «ASO» относится к нуклеиновой кислоте (например, РНК), имеющей достаточную комплементарность последовательности к РНК-мишени (например, мРНК, содержащей SNP, или пред-мРНК, содержащей SNP) для эффективного блокирования области РНК-мишени, например, способом, эффективным для ингибирования трансляции мРНК-мишени и/или сплайсинга пред-мРНК-мишени. Антисмысловый олигонуклеотид, имеющий «последовательность, в достаточной степени комплементарную РНК-мишени», означает, что антисмысловый агент имеет последовательность, достаточную для маскировки сайта связывания белка, который, в противном случае, модулировал бы сплайсинг, и/или что антисмысловый агент имеет последовательность, достаточную для маскирования сайта связывания рибосомы, и/или что антисмысловый агент имеет последовательность, достаточную для изменения трехмерной структуры РНК-мишени для предотвращения сплайсинга и/или трансляции.

Используемый в настоящем документе термин «5' конец», как и 5' конец антисмысловой цепи, относится к 5' концевым нуклеотидам, например, от одного до примерно 5 нуклеотидов на 5' конце антисмысловой цепи. Используемый в настоящем документе термин «3' конец», как и 3' конец смысловой цепи, относится к области, например, области длиной от одного до примерно 5 нуклеотидов, комплементарной нуклеотидам 5' конца комплементарной антисмысловой цепи.

Используемый в настоящем документе термин «пара оснований» относится к взаимодействию между парами нуклеотидов (или нуклеотидными аналогами) на противоположных цепях дуплекса олигонуклеотидов (например, дуплекса, образованного

нитью агента сайленсинга РНК и последовательностью мРНК-мишени), главным образом из-за Н-связей, взаимодействий Ван-дер-Ваальса и подобных между указанными нуклеотидами (или нуклеотидными аналогами). Используемый в настоящем документе термин «прочность связи» или «прочность пары оснований» относится к прочности пары оснований.

Используемый в настоящем документе термин «пара оснований с нарушением комплементарности» относится к паре оснований, состоящей из не комплементарных пар оснований или пар оснований не по Уотсону-Крику, например, не нормальных комплементарных пар оснований G:C, A:T или A:U. Используемый в настоящем документе термин «неопределенная пара оснований» (также известная как недискриминационная пара оснований) относится к паре оснований, образованной универсальным нуклеотидом.

Линкеры, используемые в конъюгированных соединениях по настоящему изобретению, включают гликолевые цепи (например, полиэтиленгликоль), алкильные цепи, пептиды, РНК, ДНК и их комбинации. Используемая в настоящем документе аббревиатура «ТЕГ» относится к триэтиленгликолю.

Дизайн олигонуклеотидов

В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, например, миРНК, по описанию представляет собой дуплекс, содержащий смысловую цепь и комплементарную антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь имеет достаточную комплементарность к мРНК-мишени, содержащей аллельный полиморфизм, для опосредования РНКи. В типовых вариантах осуществления, молекула миРНК имеет длину примерно 10-50 или более нуклеотидов, т.е. каждая цепь содержит 10-50 нуклеотидов (или нуклеотидных аналогов). В конкретных примерах осуществления, молекула миРНК имеет длину примерно 15-35, например, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20, примерно 21, примерно 22, примерно 23, примерно 24, примерно 25, примерно 26, примерно 27, примерно 28, примерно 29, примерно 30, примерно 31, примерно 32, примерно 33, примерно 34 или примерно 35 нуклеотидов в каждой цепи, где одна из цепей в достаточной степени комплементарна области-мишени.

В типовых вариантах осуществления, цепи выровнены таким образом, что на концах нитей имеется, по меньшей мере, 1, 2 или 3 основания, которые не выровнены (т.е. для которых нет комплементарных оснований в противоположной цепи), так что выступающий конец 1, 2 или 3 остатка появляются на одном или обоих концах дуплекса при отжиге нитей. В типовых вариантах осуществления, молекула миРНК имеет длину примерно 10-50 или более нуклеотидов, т.е. каждая цепь содержит 10-50 нуклеотидов (или нуклеотидных аналогов). В конкретных примерах осуществления, молекула миРНК имеет длину примерно 15-35, например, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20, примерно 21, примерно 22, примерно 23, примерно 24, примерно 25, примерно 26, примерно 27, примерно 28, примерно 29, примерно 30, примерно 31, примерно 32, примерно 33, примерно 34 или примерно 35

нуклеотидов в каждой цепи, где одна из цепей по существу комплементарна последовательности-мишени, содержащей аллельный полиморфизм, и другая цепь является комплементарной или по существу комплементарной первой цепи. В одном варианте осуществления, молекула миРНК полностью комплементарна последовательности-мишени, содержащей аллельный полиморфизм, за исключением одного дополнительного нарушения комплементарности, также известного как вторичное нарушение комплементарности.

В некоторых вариантах осуществления, каждая цепь содержит от 10 до 50 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов (например, 10 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 11 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 12 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 13 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 14 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 19 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 21 нуклеотид или нуклеотидный аналог, 22 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 23 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 24 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 25 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 26 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 27 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 28 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 29 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 30 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 31 нуклеотид или нуклеотидный аналог, 32 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 33 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 34 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 35 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 36 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 37 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 38 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 39 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 40 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 41 нуклеотид или нуклеотидный аналог, 42 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 43 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 44 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 45 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 46 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 47 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 48 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 49 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов или 50 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов). В некоторых вариантах осуществления, каждая цепь содержит от 10 до 49 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов (например, 10 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 11 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 12 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 13 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 14 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 19 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 21 нуклеотид или нуклеотидный аналог, 22 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 23 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 24 нуклеотида или нуклеотидных аналога, 25 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 26 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 27 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, 28 нуклеотидов или

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), и смысловая цепь имеет длину от 10 до 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, например, длину от 11 до 19 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, длину от 12 до 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, длину от 13 до 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов или длину от 14 до 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 10 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 11 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 12 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 13 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 14 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет

длину 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 19 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), где антисмысловая цепь имеет длину от 15 до 25 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и смысловая цепь имеет длину от 10 до 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь имеет длину от 16 до 24 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и смысловая цепь имеет длину от 11 до 19 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь имеет длину от 17 до 23 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и смысловая цепь имеет длину от 12 до 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь имеет длину от 18 до 22 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и смысловая цепь имеет длину от 13 до 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь имеет длину от 19 до 21 нуклеотида или нуклеотидного аналога, и смысловая цепь имеет длину от 14 до 16 нуклеотида или нуклеотидного аналога.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), где антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и длина смысловой цепи составляет 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), где антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид или нуклеотидный аналог, и смысловая цепь имеет длину 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), где антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и смысловая цепь имеет длину 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, миРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь (например, как описано выше), где антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид или нуклеотидный аналог, и смысловая цепь имеет длину 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

Как правило, миРНК можно сконструировать с использованием любого способа, известного в данной области техники, например, с использованием следующего

протокола:

1. миРНК может быть специфичной для последовательности-мишени, которая содержит аллельный полиморфизм. В типовых вариантах осуществления, первая цепь по существу комплементарна последовательности-мишени, содержащей аллельный полиморфизм, имеющий одно нарушение комплементарности с последовательностью-мишенью, содержащей аллельный полиморфизм, и другая цепь по существу комплементарна первой цепи. В одном варианте осуществления, последовательность-мишень находится за пределами кодирующей области гена-мишени. Типовые последовательности-мишени выбирают из 5' нетранслируемой области (5' UTR) или интронной области гена-мишени. Расщепление мРНК по этим сайтам должно устранять трансляцию соответствующего мутантного белка. Последовательности-мишени из других областей гена *htt* также подходят для таргетирования. Смысловую цепь конструируют на основе последовательности-мишени. Кроме того, миРНК с более низким содержанием G/C (35-55%) могут быть более активными, чем миРНК с содержанием G/C выше 55%. Таким образом, В одном варианте осуществления, изобретение включает молекулы нуклеиновых кислот с содержанием G/C 35-55%.

2. Смысловую нить миРНК конструируют на основе последовательности выбранного сайта-мишени и положения аллельного полиморфизма. В типовых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию не вызывают ответа РKR (т.е. имеют достаточно короткую длину). Однако более длинные агенты сайленсинга РНК могут быть полезны, например, в типах клеток, неспособных создавать ответ РKR, или в ситуациях, когда ответ РKR подавляется или демпфируется альтернативными средствами.

Молекулы миРНК по описанию обладают достаточной комплементарностью с последовательностью-мишенью, так что миРНК может опосредовать РНКи. Как правило, используют миРНК, содержащие нуклеотидные последовательности, достаточно идентичные части последовательности-мишени гена-мишени для осуществления RISC-опосредованного расщепления гена-мишени. Соответственно, в иллюстративном варианте, смысловая цепь миРНК должна иметь последовательность, достаточно идентичную части мишени, которая содержит аллельный полиморфизм. Преимущество описания заключается в том, что оно позволяет допускать определенные вариации последовательности для повышения эффективности и специфичности РНК интерференции. В одном аспекте, смысловая цепь имеет 1 нуклеотид с нарушением комплементарности с областью-мишенью, содержащей аллельный полиморфизм, такой как область-мишень, которая отличается, по меньшей мере, на одну пару оснований между аллелем дикого типа и мутантным аллелем, например, область-мишень, содержащая мутацию с приобретением функции, и другая цепь идентична или по существу идентична первой цепи. В некоторых вариантах осуществления, нарушение комплементарности находится на 4 нуклеотида выше, на 3 нуклеотида выше нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, на 2 нуклеотида выше нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, на 1 нуклеотид выше, на 1 нуклеотид ниже

нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, на 2 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, на 3 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, на 4 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму или на 5 нуклеотидов ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму. В некоторых вариантах, нарушение комплементарности не является соседним с нуклеотидом, соответствующим аллельному полиморфизму. Кроме того, последовательности миРНК с небольшими вставками или делециями из 1 или 2 нуклеотидов также могут быть эффективны для опосредования РНКи. Альтернативно, последовательности миРНК с заменами или вставками нуклеотидных аналогов могут быть эффективными для ингибирования.

Идентичность последовательности можно определить с помощью алгоритмов сравнения последовательностей и выравнивания, известных в данной области техники. Для определения доли идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот (или двух аминокислотных последовательностей), последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в первую последовательность или вторую последовательность для оптимального выравнивания могут быть введены гэпы). Затем сравнивают нуклеотиды (или аминокислотные остатки) в соответствующих положениях нуклеотидов (или аминокислот). Если положение в первой последовательности занято тем же остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Доля идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. доля (%) гомологии = количество идентичных положений / общее количество положений $\times 100$), при необходимости штрафуя оценку за количество введенных гэпов и/или длину введенных гэпов.

Сравнение последовательностей и определение доли идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с помощью математического алгоритма. В одном варианте осуществления, выравнивание производится по определенной части последовательности, имеющей достаточную идентичность, но не по частям, имеющим низкую степень идентичности (т.е. локальное выравнивание). Типовым неограничивающим примером алгоритма локального выравнивания, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, модифицированный как у Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77. Такой алгоритм включен в программы BLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

В другом варианте осуществления, выравнивание оптимизируется путем введения соответствующих гэпов, и доля идентичности определяется по длине выровненных последовательностей (т.е. выравнивания с гэпами). Для получения выравнивания с гэпами в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. В другом варианте осуществления, выравнивание оптимизируют путем введения соответствующих гэпов и определяют долю идентичности

по всей длине выровненных последовательностей (т.е. глобальное выравнивание). Типовым неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для глобального сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за удлинение гэпа 12 и штраф за гэп 4.

3. Антисмысловая или направляющая цепь миРНК обычно имеет ту же длину, что и смысловая цепь, и включает комплементарные нуклеотиды. В одном варианте осуществления, направляющая и смысловая цепи полностью комплементарны, т. е. цепи имеют тупые концы при выравнивании или отжиге. В другом варианте осуществления, цепи миРНК могут быть спарены таким образом, чтобы иметь липкий 3' конец длиной от 1 до 4, например, 2 нуклеотида. Липкие концы могут содержать (или состоять из) нуклеотидов, соответствующих последовательности гена-мишени (или ее комплемента). Альтернативно, липкие концы могут содержать (или состоять из) дезоксирибонуклеотиды, например, dT, или нуклеотидные аналоги, или другой подходящий не нуклеотидный материал. Таким образом, в другом варианте осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты могут иметь 3' липкий конец из 2 нуклеотидов, такой как TT. Нуклеотиды с липкими концами могут быть либо РНК, либо ДНК. Как отмечалось выше, желательно выбрать область-мишень, в которой нарушение комплементарности мутант:дикий тип представляет собой нарушение комплементарности пурин:пурин.

4. Используя любой способ, известный в данной области техники, сравнивают потенциальные мишени с соответствующей базой данных геномов (человека, мыши, крысы и т. д.) и исключают из рассмотрения любые последовательности-мишени со значительной гомологией с другими кодирующими последовательностями. Один из таких способов для такого поиска гомологии последовательностей известен как BLAST, который доступен на веб-сайте National Center for Biotechnology Information.

5. Выбирают одну или несколько последовательностей, соответствующих критериям оценки.

Дополнительную общую информацию о дизайне и использовании миРНК можно найти в «The siRNA User Guide», доступном на веб-сайте The Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie.

Альтернативно, миРНК может быть функционально определена как нуклеотидная последовательность (или олигонуклеотидная последовательность), которая способна гибридизоваться с последовательностью-мишенью (например, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C гибридизация в течение 12-16 часов с последующей промывкой). Дополнительные типовые условия гибридизации включают гибридизацию при 70°C в 1xSSC или 50°C в 1xSSC, 50% формамиде с последующей

промывкой при 70°C в 0,3xSSC или гибридизацию при 70°C в 4xSSC или 50°C в 4xSSC, 50% формамиде с последующей промывкой при 67°C в 1xSSC. Температура гибридизации для гибридов, которые, как ожидается, будут иметь длину менее 50 пар оснований, должна быть на 5-10°C ниже температуры плавления (T_m) гибрида, где T_m определяется в соответствии со следующими уравнениями. Для гибридов длиной менее 18 пар оснований $T_m(^{\circ}\text{C})=2(\text{количество оснований A+T})+4(\text{количество оснований G+C})$. Для гибридов длиной от 18 до 49 пар оснований $T_m(^{\circ}\text{C})=81,5+16,6(\log 10[\text{Na}^+])+0,41(\% \text{G+C})-(600/N)$, где N представляет собой количество оснований в гибриде, и $[\text{Na}^+]$ представляет собой концентрацию ионов натрия в гибридизационном буфере ($[\text{Na}^+]$ для 1xSSC=0,165 M). Дополнительные примеры строгих условий гибридизации полинуклеотидов приведены в Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F. M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., разделы 2.10 и 6.3-6.4, полностью включенные в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

миРНК отрицательного контроля должны иметь тот же нуклеотидный состав, что и выбранная миРНК, но без существенной комплементарности последовательности соответствующему геному. Такие отрицательные контроли могут быть созданы путем случайной перестановки нуклеотидной последовательности выбранной миРНК. Можно выполнить поиск гомологии, чтобы убедиться, что в отрицательном контроле отсутствует гомология с каким-либо другим геном в соответствующем геноме. Кроме того, миРНК отрицательного контроля можно сконструировать путем введения в последовательность одного или нескольких оснований с нарушением комплементарности.

6. Для подтверждения эффективности, с которой миРНК разрушает мРНК-мишени (например, мРНК дикого типа или мутантного хантингтина), миРНК может быть инкубирована с кДНК-мишенью (например, кДНК хантингтина) в системе экспрессии мРНК *in vitro* на основе *Drosophila*. Радиоактивно меченные ^{32}P , вновь синтезированные мРНК-мишени (например, мРНК хантингтина) выявляют ауторадиографически на агарозном геле. Наличие расщепленной мРНК-мишени указывает на активность нуклеазы мРНК. Подходящие контроли включают пропуск миРНК и использование кДНК вне мишени. Альтернативно, выбирают контрольные миРНК, имеющие тот же нуклеотидный состав, что и выбранная миРНК, но без значительной комплементарности последовательностей соответствующему гену-мишени. Такие отрицательные контроли могут быть созданы путем случайной перестановки нуклеотидной последовательности выбранной миРНК. Можно выполнить поиск гомологии, чтобы убедиться, что в отрицательном контроле отсутствует гомология с каким-либо другим геном в соответствующем геноме. Кроме того, миРНК отрицательного контроля можно сконструировать путем введения в последовательность одного или нескольких оснований с нарушением комплементарности.

миРНК могут быть сконструированы для таргетирования любой из

последовательностей-мишеней, описанных *выше*. Указанные миРНК содержат антисмысловую цепь, которая в достаточной степени комплементарна последовательности-мишени, чтобы опосредовать сайленсинг последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления, агент сайленсинга РНК представляет собой миРНК.

Выбирают сайты комплементарности миРНК-мРНК, что приводит к оптимальной специфичности мРНК и максимальному расщеплению мРНК.

миРНК-подобные молекулы

миРНК-подобные молекулы по настоящему описанию имеют последовательность (т.е. имеют цепь, имеющую последовательность), которая «достаточно комплементарна» последовательности-мишени мРНК (например, мРНК htt), чтобы направлять сайленсинг генов либо с помощью РНКи, либо с помощью репрессии трансляции. миРНК-подобные молекулы конструируются таким же образом, как и молекулы миРНК, но степень идентичности последовательностей между смысловой цепью и РНК-мишенью приближается к наблюдаемой между микроРНК и ее мишенью. В общем, когда степень идентичности последовательности между последовательностью микроРНК и соответствующей последовательностью гена-мишени снижается, увеличивается тенденция к опосредованию посттранскрипционного сайленсинга генов посредством репрессии трансляции, а не РНКи. Следовательно, в альтернативном варианте осуществления, где желательно посттранскрипционный сайленсинг гена путем репрессии трансляции гена-мишени, последовательность микроРНК имеет частичную комплементарность последовательности гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, последовательность микроРНК частично комплементарна одной или нескольким коротким последовательностям (сайтам комплементарности), распределенным в пределах мРНК-мишени (например, в пределах 3' UTR мРНК-мишени) (Hutvagner and Zamore, Science, 2002; Zeng et al., Mol. Cell, 2002; Zeng et al., RNA, 2003; Doench et al., Genes & Dev., 2003). Поскольку механизм репрессии трансляции является кооперативным, в некоторых вариантах осуществления, мишенями могут быть несколько сайтов комплементарности (например, 2, 3, 4, 5 или 6).

Способность миРНК-подобного дуплекса опосредовать РНКи или репрессию трансляции можно предсказать по распределению не идентичных нуклеотидов между последовательностью гена-мишени и последовательностью нуклеотидов агента сайленсинга в сайте комплементарности. В одном варианте осуществления, где желателен сайленсинг генов посредством репрессии трансляции, по меньшей мере, один не идентичный нуклеотид присутствует в центральной части сайта комплементарности, так что дуплекс, образованный направляющей цепью микроРНК и мРНК-мишенью, содержит центральное «выпетливание» (Doench J G et al., Genes & Dev., 2003). В другом варианте осуществления, вводят 2, 3, 4, 5 или 6 непрерывных или не непрерывных не идентичных нуклеотидов. Не идентичный нуклеотид может быть выбран так, чтобы он образовывал неоднозначную пару оснований (например, G:U) или пару оснований с нарушением

комплементарности (G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C, U:U). В другом типовом варианте осуществления, «выпетливание» центрировано в положениях нуклеотидов 12 и 13 от 5' конца молекулы микроРНК.

Модифицированные агенты сайленсинга РНК

В некоторых аспектах настоящего изобретения агент сайленсинга РНК (или любую его часть) согласно настоящему описанию, как описано выше, может быть модифицирован таким образом, что активность этого агента будет дополнительно улучшена. Например, агенты сайленсинга РНК, описанные выше, могут быть модифицированы любой из модификаций, описанных ниже. Модификации могут частично служить для дальнейшего улучшения распознавания мишеней, повышения стабильности агента (например, для предотвращения деградации), стимуляции поглощения клетками, повышения эффективности мишени, повышения эффективности связывания (например, с мишенями), улучшения переносимости препарата пациентом и/или для снижения токсичности.

1) Модификации для улучшения распознавания мишени

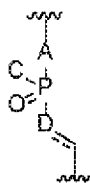
В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК, по настоящему изобретению могут быть заменены дестабилизирующим нуклеотидом для усиления распознавания однонуклеотидной мишени (см. заявку США с серийным № 11/698,689, поданную 25 января 2007 г., и предварительную заявку США № 60/762,225, поданную 25 января 2006 г., обе включены в настоящий документ посредством ссылки). Такая модификация может быть достаточной для отмены специфичности агента сайленсинга РНК в отношении мРНК, не являющейся мишенью (например, мРНК дикого типа), без существенного влияния на специфичность агента сайленсинга РНК в отношении мРНК-мишени (например, мРНК с мутацией с приобретением функции).

В некоторых типовых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению модифицируют путем введения, по меньшей мере, одного универсального нуклеотида в их антисмысловую цепь. Универсальные нуклеотиды содержат части оснований, которые способны образовывать пары оснований без разбора с любым из четырех обычных нуклеотидных оснований (например, А, G, C, U). Обычно используют универсальный нуклеотид, поскольку он оказывает относительно незначительное влияние на стабильность дуплекса РНК или дуплекса, образованного направляющей цепью агента сайленсинга РНК и мРНК-мишени. Типовые универсальные нуклеотиды включают нуклеотиды, имеющие часть основания инозина или часть основания аналога инозина, выбранную из группы, состоящей из дезоксиинозина (например, 2'-дезоксиинозина), 7-деаза-2'-дезоксиинозина, 2'-аза-2'-дезоксиинозина, РНА-инозина, морфолино-инозина, LNA-инозина, фосфорамидат-инозина, 2'-О-метоксиэтил-инозина и 2'-ОМе-инозина. В конкретных типовых вариантах осуществления, универсальный нуклеотид представляет собой остаток инозина или его природный аналог.

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию модифицируют путем введения, по меньшей мере, одного дестабилизирующего

нуклеотида в пределах 11 нуклеотидов от определяющего специфичность нуклеотида (например, в пределах 11 нуклеотидов от нуклеотида, который распознает связанный с заболеванием полиморфизм (например, нуклеотида в положении SNP)). Например, дестабилизирующий нуклеотид может быть введен в положение, которое находится в пределах 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида(ов) от определяющего специфичность нуклеотида. В типовых вариантах осуществления, дестабилизирующий нуклеотид вводят в положение, которое находится в 3 нуклеотидах от определяющего специфичность нуклеотида (т.е. так, что между дестабилизирующим нуклеотидом и определяющим специфичность нуклеотидом находились 2 стабилизирующих нуклеотида). В агентах сайленсинга РНК, имеющих две цепи или части цепей (например, миРНК и кшРНК), дестабилизирующий нуклеотид может быть введен в цепь или часть цепи, которая не содержит нуклеотид, определяющий специфичность. В конкретных типовых вариантах осуществления, дестабилизирующий нуклеотид вводят в ту же цепь или часть цепи, которая содержит нуклеотид, определяющий специфичность.

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию модифицированы путем введения модифицированной межсубъединичной связи Формулы 1:



(1)

в которой:

D выбран из группы, состоящей из O, OCH₂, OCH, CH₂ и CH;

C выбран из группы, состоящей из O⁻, OH, OR¹, NH⁻, NH₂, S⁻ и SH;

A выбирают из группы, состоящей из O и CH₂;

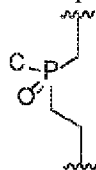
R¹ представляет собой защитную группу;

==== представляет собой необязательную двойную связь; и

межсубъединица соединяет два необязательно модифицированных нуклеозида.

В варианте осуществления, когда C представляет собой O⁻, либо A, либо D не является O.

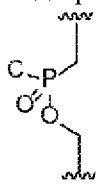
В одном варианте осуществления, D представляет собой CH₂. В другом варианте осуществления, модифицированная межсубъединичная связь Формулы VIII представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 2:



(2)

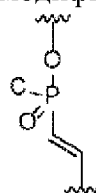
В одном варианте осуществления, D представляет собой O. В другом варианте

осуществления, модифицированная межсубъединичная связь Формулы VIII представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 3:



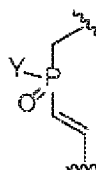
(3)

В одном варианте осуществления, D представляет собой CH. В другом варианте осуществления, модифицированная межсубъединичная связь Формулы VIII представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 4:



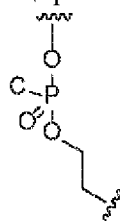
(4)

В другом варианте осуществления, модифицированная межсубъединичная связь представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 5:



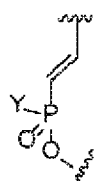
(5).

В одном варианте осуществления, D представляет собой OCH₂. В другом варианте осуществления, модифицированная межсубъединичная связь представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 6:



(6).

В другом варианте осуществления, модифицированная межсубъединичная связь Формулы VII представляет собой модифицированную межсубъединичную связь Формулы 7:

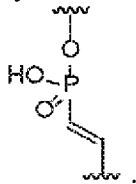


(7).

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по настоящему

изобретению модифицируют путем введения одного или нескольких межсубъединичных линкеров, показанных на **ФИГ. 43**. В типовом варианте осуществления, межсубъединичный линкер с **ФИГ. 43** вставлен между нуклеотидом в положении SNP и нуклеотидом в положении, непосредственно примыкающем к нуклеотиду в положении SNP антисмысловой цепи и по обе стороны от него.

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению модифицированы путем введения одного или нескольких винилфосфонатных (VP) мотивов в межсубъединичный линкер, имеющий следующую формулу:



В некоторых вариантах осуществления, мотив VP встроен в любое положение(я) олигонуклеотида, например, РНК. Например, для олигонуклеотида длиной 20 нуклеотидов мотив VP может быть вставлен в положения 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-8, 8-9, 9-10, 10-11, 11-12, 12-13, 13-14, 14-15, 15-16, 16-17, 17-18, 18-19 или 19-20 и в любых их комбинациях.

В некоторых типовых вариантах осуществления, мотив VP встроен в одно или несколько положений 1-2, 5-6, 6-7, 10-11, 18-19 и/или 19-20 антисмысловой цепи.

В других типовых вариантах осуществления, мотив VP встроен в одно или несколько положений 1-2, 6-7, 10-11 и/или 19-20 антисмысловой цепи.

В иллюстративном варианте осуществления, мотив VP встроен рядом с (т.е. между нуклеотидом в положении SNP и нуклеотидом в положении, непосредственно примыкающем к и по обе стороны от) нуклеотида в положении SNP антисмысловой цепи. В другом иллюстративном варианте осуществления, мотив VP встроен рядом с (т.е. между нуклеотидом в положении ММ и нуклеотидом в положении, непосредственно примыкающем к и с любой стороны) нуклеотида в положении ММ антисмысловой цепи.

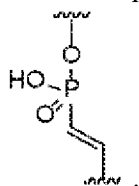
2) Модификации для повышения эффективности и специфичности

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию могут быть изменены для обеспечения повышенной эффективности и специфичности при опосредовании РНКи в соответствии с правилами дизайна асимметрии (см. патенты США №№ 8,309,704, 7,750,144, 8,304,530, 8,329,892 и 8,309,705). Такие изменения облегчают проникновение антисмысловой цепи миРНК (например, миРНК, сконструированной с использованием способов по описанию, или миРНК, полученной из кшРНК) в RISC в пользу смысловой цепи, так что антисмысловая нить предпочтительно управляет расщеплением или репрессией трансляции мРНК-мишени и, таким образом, увеличение или улучшение эффективности расщепления и сайленсинга мишени. В типовых вариантах осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК усиливается за счет уменьшения силы пары оснований между 5' концом антисмысловой цепи (AS 5') и 3' концом

смысловой цепи (S 3') агента сайленсинга РНК по сравнению с прочностью связи или прочностью пары оснований между 3' концом антисмысловой цепи (AS 3') и 5' концом смысловой цепи (S' 5') указанного агента сайленсинга РНК.

В одном варианте осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом части смысловой цепи будет меньше пар оснований G:C, чем между 3' концом первой или антисмысловой цепи и 5' концом части смысловой цепи. В другом варианте осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК по описанию может быть усилена таким образом, что между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом части смысловой цепи имеется, по меньшей мере, одна пара оснований с нарушением комплементарности. В типовом варианте осуществления, пара оснований с нарушением комплементарности выбрана из группы, состоящей из G:A, C:A, C:U, G:G, A:A, C:C и U:U. В другом варианте осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что между 5' концом первой или антисмысловой цепи и 3' концом части смысловой цепи имеется, по меньшей мере, одна неоднозначная пара оснований, например, G:U. В другом варианте осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что имеется, по меньшей мере, одна пара оснований, содержащая редкий нуклеотид, например, инозин (I). В типовых вариантах осуществления, пара оснований выбрана из группы, состоящей из I:A, I:U и I:C. В еще одном варианте осуществления, асимметрия агента сайленсинга РНК по настоящему изобретению может быть усилена таким образом, что имеется, по меньшей мере, одна пара оснований, содержащая модифицированный нуклеотид. В конкретных вариантах осуществления, модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2-амино-G, 2-амино-A, 2,6-диамино-G и 2,6-диамино-A.

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию изменены в одной или нескольких межсубъединичных связях в олигонуклеотиде путем введения винилфосфонатного (VP) мотива, имеющего следующую формулу:



3) Агенты сайленсинга РНК с повышенной стабильностью

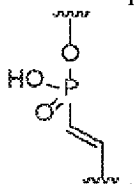
Агенты сайленсинга РНК, по настоящему изобретению могут быть модифицированы для улучшения стабильности в сыворотке или в среде для выращивания клеточных культур. Для повышения стабильности, 3' остатки могут быть стабилизированы против деградации, например, они могут быть выбраны таким образом, чтобы они состояли из пуриновых нуклеотидов, в частности, аденозиновых или гуанозиновых нуклеотидов. Альтернативно, замена пиримидиновых нуклеотидов модифицированными аналогами, например замена уридина на 2'-дезокситимидин,

допустима и не влияет на эффективность РНК интерференции.

В конкретном аспекте, изобретение относится к агентам сайленсинга РНК, которые включают первую и вторую цепи, где вторая цепь и/или первая цепь модифицированы заменой внутренних нуклеотидов модифицированными нуклеотидами, так что стабильность *in vivo* повышается по сравнению с соответствующим не модифицированным агентом сайленсинга РНК. Как определено в настоящем документе, «внутренний» нуклеотид представляет собой нуклеотид, находящийся в любом положении, отличном от 5' конца или 3' конца молекулы нуклеиновой кислоты, полинуклеотида или олигонуклеотида. Внутренний нуклеотид может находиться внутри одноцепочечной молекулы или внутри цепи дуплексной или двухцепочечной молекулы. В одном варианте осуществления, смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицирована заменой, по меньшей мере, одного внутреннего нуклеотида. В другом варианте осуществления, смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицирована заменой, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более внутренних нуклеотидов. В другом варианте осуществления, смысловая цепь и/или антисмысловая цепь модифицирована заменой, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более внутренних нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления, смысловую цепь и/или антисмысловую цепь модифицируют заменой всех внутренних нуклеотидов.

В конкретном варианте осуществления настоящего описания, агенты сайленсинга РНК, могут содержать, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотидный аналог. Нуклеотидные аналоги могут быть расположены в положениях, где мишень-специфическая активность сайленсинга, например, РНКи опосредующая активность или активность репрессии трансляции, существенно не затронуты, например, в области на 5' конце и/или 3' конце молекулы миРНК. В частности, концы можно стабилизировать путем включения модифицированных нуклеотидных аналогов.

В некоторых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию изменены в одной или нескольких межсубъединичных связях в олигонуклеотиде путем введения винилфосфонатного (VP) мотива, имеющего следующую формулу:



Различные типы олигонуклеотидов (например, гэтмеры, миксмеры, ингибиторы микроРНК, сплайс-переключающие олигонуклеотиды («SSO»), фосфородиамидатные морфолиноолигонуклеотиды («PMO»), пептидные нуклеиновые кислоты («PNA») и подобные) могут быть использованы в олигонуклеотидах, описанных в настоящем документе, необязательно с использованием различных комбинаций модификаций (например, химических модификаций) и/или конъюгаций, описанных в настоящем

документе и, например, в заявке США с серийным № 15/089,423; заявке США с серийным № 15/236,051; заявке США с серийным № 15/419,593; заявке США с серийным № 15/697,120 и патенте США № 9,809,817; и заявке США с серийным № 15/814,350 и патенте США № 9,862,350, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Примеры нуклеотидных аналогов включают рибонуклеотиды с модифицированным сахаром и/или остовом (т.е. включают модификации фосфатно-сахарного остова). Например, фосфодизфирные связи природной РНК могут быть модифицированы для включения, по меньшей мере, одного из гетероатомов азота или серы. В типовых рибонуклеотидах с модифицированным остовом, фосфоэфирная группа, соединяющаяся с соседними рибонуклеотидами, заменена модифицированной группой, например фосфотиоатной группой. В типовых рибонуклеотидах с модифицированным сахаром 2'-ОН-группа заменена группой, выбранной из H, OR, R, галогена, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ или ON, где R представляет собой C₁-C₆ алкил, алкенил или алкинил, и галоген представляет собой F, Cl, Br или I.

В конкретных вариантах осуществления, модификации представляют собой 2'-фтор, 2'-амино и/или 2'-тио модификации. В частности, типовые модификации включают 2'-фторцитидин, 2'-фторуридин, 2'-фторадеозин, 2'-фторгуанозин, 2'-аминоцитидин, 2'-аминоуридин, 2'-аминоадеозин, 2'-аминогуанозин, 2,6-диаминопурин, 4-тиоуридин и/или 5-аминоаллилуридин. В конкретном варианте осуществления, каждый 2'-фтор-рибонуклеотид представляет собой уридин и цитидин. Дополнительные типовые модификации включают 5-бромурин, 5-йодуридин, 5-метилцитидин, риботимидин, 2-аминопурин, 2'-аминобутирилпиренуридин, 5-фторцитидин и 5-фторуридин. 2'-дезоксинуклеотиды и 2'-Оме нуклеотиды также могут быть использованы в составах модифицированных агентов сайленсинга РНК по настоящему описанию. Дополнительные модифицированные остатки включают дезоксиосновы, инозин, N3-метилуридин, N6,N6-диметиладенозин, псевдоуридин, пуринрибонуклеозид и рибавирин. В особенно типовом варианте осуществления, 2'-группа представляет собой метильную группу, так что связывающая группа представляет собой 2'-О-метильный олигонуклеотид.

В типовом варианте осуществления, агент сайленсинга РНК по описанию содержит заблокированные нуклеиновые кислоты (LNA). LNA содержат нуклеотиды, модифицированные сахаром, которые устойчивы к нуклеазной активности (являются очень стабильными) и обладают свойством распознавания отдельных нуклеотидов для мРНК (Elmen et al., *Nucleic Acids Res.*, (2005), 33(1): 439-447; Braasch et al. (2003) *Biochemistry* 42:7967-7975, Petersen et al. (2003) *Trends Biotechnol.* 21:74-81). Эти молекулы имеют нуклеиновые кислоты с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком с возможными модификациями, такими как 2'-деокси-2"-фторуридин. Кроме того, LNA повышают специфичность олигонуклеотидов, связывая сахарную группу в 3'-эндо конформацию, тем самым предварительно организуя нуклеотид для спаривания оснований и повышая температуру плавления олигонуклеотида на не более 10°C на основание.

В другом иллюстративном варианте осуществления, агент сайленсинга РНК по описанию содержит пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). PNA содержат модифицированные нуклеотиды, в которых сахарофосфатная часть нуклеотида заменена нейтральной 2-аминоэтилглициновой группой, способной образовывать полиамидный остов, обладающий высокой устойчивостью к расщеплению нуклеазами и придающий молекуле улучшенную специфичность связывания (Nielsen, et al., Science, (2001), 254: 1497-1500).

В некоторых типовых вариантах осуществления, используются рибонуклеотиды с модифицированным нуклеотидным основанием, т.е. рибонуклеотиды, содержащие, по меньшей мере, одно не встречающееся в природе нуклеотидное основание вместо природного нуклеотидного основания. Основания могут быть модифицированы для блокирования активности аденозиндезаминазы. Примеры модифицированных нуклеотидных оснований включают, но не ограничены ими, уридин и/или цитидин, модифицированный в положении 5, например, 5-(2-амино)пропилуридин, 5-бромурин; аденозин и/или гуанозины, модифицированные в положении 8, например, 8-бромгуанозин; дезануклеотиды, например, 7-дезааденозин; О- и N-алкилированные нуклеотиды, например, N6-метиладенозин. Следует отметить, что вышеуказанные модификации могут быть объединены.

В других вариантах осуществления, перекрестное связывание можно использовать для изменения фармакокинетики агента сайленсинга РНК, например, для увеличения времени полужизни в организме. Таким образом, изобретение включает агенты сайленсинга РНК, имеющие две комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, где две цепи поперечно сшиты. Настоящее описание также включает агенты сайленсинга РНК, которые конъюгированы или не конъюгированы (например, на 3' конце) с другой группой (например, группой не нуклеиновой кислоты, такой как пептид), органическим соединением (например, красителем) или подобным). Модификация производных миРНК таким образом может улучшить поглощение клеткой или усилить клеточную таргетную активность полученного производного миРНК по сравнению с соответствующей миРНК, полезна для отслеживания производного миРНК в клетке или улучшает стабильность производного миРНК по сравнению с соответствующей миРНК.

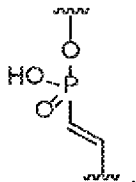
Другие типовые модификации включают: (a) 2'-модификацию, например, получение 2'-Оме группы на U в смысловой или антисмысловой цепи, но особенно в смысловой цепи, или включение 2'-Оме группы в 3' липкий конец, например, на 3' конце (3' конец означает 3' атом молекулы или не более 3' группы, например, на большем 3' Р или 2' положении, как указано в контексте); (b) модификацию остова, например, с заменой O на S, в фосфатном остове, например, получение фосфоротриоатной модификации на U или A или на обоих, особенно на антисмысловой цепи; например, с заменой P на S; (c) замену U C5 amino линкером; (d) замену A на G (в большинстве случаев изменения последовательности локализуются в смысловой цепи, но не в антисмысловой цепи); и (d) модификацию в положении 2', 6', 7' или 8'. Типовыми вариантами осуществления

являются те, в которых одна или несколько из этих модификаций присутствуют в смысловой, но не антисмысловой цепи, или варианты осуществления, в которых антисмысловая цепь имеет меньше таких модификаций. Другие типовые модификации включают использование метилированного Р на 3' липком конце, например, на 3' конце; комбинацию 2' модификации, например, получение 2'-ОМе группы и модификации остова, например, с заменой Р на S, например, получение фосфоротиоатной модификации или использование метилированного Р, на 3' липком конце, например, на 3' конце; модификацию 3' алкилом; модификацию пирролидоном с удаленным азотистым основанием на 3' липком конце, например, на 3' конце; модификацию напроксеном, ибупрофеном или другими группами, которые ингибируют деградацию на 3' конце.

4) Модификации для улучшения клеточного поглощения

В других вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК, могут быть модифицированы химическими группами, например, для усиления клеточного поглощения клетками-мишенями (например, нервными клетками). Таким образом, изобретение включает агенты сайленсинга РНК, которые конъюгированы или не конъюгированы (например, на 3' конце) с другой группой (например, группой не нуклеиновой кислоты, такой как пептид), органическим соединением (например, красителем) или подобным. Конъюгацию можно осуществить способами, известными в данной области техники, например, с использованием способов Lambert et al., Drug Deliv. Rev.: 47(1), 99-112 (2001) (описаны нуклеиновые кислоты, загруженные в наночастицы полиалкилцианоакрилата (PACA)); Fattal et al., J. Control Release 53(1-3):137-43 (1998) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами); Schwab et al., Ann. Oncol. 5 Suppl. 4:55-8 (1994) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с интеркалирующими агентами, гидрофобными группами, поликатионами или наночастицами PACA); и Godard et al., Eur. J. Biochem. 232(2):404-10 (1995) (описаны нуклеиновые кислоты, связанные с наночастицами).

В конкретном варианте осуществления, модификация агентов сайленсинга РНК по описанию содержит мотив винилфосфоната (VP) в одном или нескольких межсубъединичных линкерах олигонуклеотида, где мотив VP имеет следующую формулу:



В конкретном варианте осуществления, агент сайленсинга РНК по настоящему изобретению конъюгирован с липофильной группой. В одном варианте липофильная группа представляет собой лиганд, который включает катионную группу. В другом варианте осуществления, липофильная группа присоединена к одной или обеим цепям миРНК. В типовом варианте осуществления, липофильная группа присоединена к одному концу смысловой цепи миРНК. В другом типовом варианте осуществления, липофильная группа присоединена к 3' концу смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления,

липофильная группа выбрана из группы, состоящей из холестерина, витамина Е, витамина К, витамина А, фолиевой кислоты или катионного красителя (например, Cu^{2+}). В типовом варианте осуществления, липофильная группа представляет собой холестерин. Другие липофильные группы включают холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

5) Связанные лиганды

Другие объекты могут быть связаны с агентом сайленсинга РНК по описанию. Например, лиганд, связанный с агентом сайленсинга РНК, для улучшения стабильности, термодинамики гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, таргетирования конкретной ткани или типа клеток или клеточной проницаемости, например, с помощью эндоцитоз-зависимого или не зависимого механизма. Лиганды и ассоциированные с ними модификации также могут повышать специфичность последовательности и, следовательно, уменьшать таргетирование вне сайта. Связанный лиганд может включать одно или несколько модифицированных оснований или сахаров, которые могут действовать как интеркаляторы. В некоторых типовых вариантах осуществления, они расположены во внутренней области, такой как выпетливание дуплекса агент сайленсинга РНК/мишень. Интеркалятор может быть ароматическим, например, полициклическим ароматическим или гетероциклическим ароматическим соединением. Полициклический интеркалятор может иметь способность к штабелированию и может включать системы с 2, 3 или 4 конденсированными кольцами. Описанные в настоящем документе универсальные основания могут быть включены в лиганд. В одном варианте осуществления, лиганд может включать расщепляющую группу, которая способствует ингибированию гена-мишени путем расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Расщепляющая группа может представлять собой, например, блеомицин (например, блеомицин-А5, блеомицин-А2 или блеомицин-В2), пирен, фенантролин (например, О-фенантролин), полиамин, трипептид (например, lys-tyr-lys трипептид), или группу, хелатирующую ион металла. Группа, хелатирующая ион металла, может включать, например, макроциклический комплекс Lu(III) или Eu(III) , производное Zn(II) 2,9-диметилфенантролина, Cu(II) терпиридин, или акридин, которые могут способствовать селективному расщеплению РНК-мишени в месте выпетливания свободными ионами металлов, таких как Lu(III) . В некоторых вариантах осуществления, пептидный лиганд может быть связан с агентом сайленсинга РНК для стимуляции расщепления РНК-мишени, например, в области выпетливания. Например, 1,8-диметил-1,3,6,8,10,13-гексаазациклотетрадекан (циклам) может быть конъюгирован с пептидом (например, производным аминокислоты) для стимуляции расщепления РНК-мишени. Связанный лиганд может представлять собой аминогликозидный лиганд, который может придавать

агенту сайленсинга, улучшенные свойства гибридизации или улучшенную специфичность последовательности. Типовые аминогликозиды включают гликозилированный полилизин, галактозилированный полилизин, неомицин В, тобрамицин, канамицин А и акридиновые конъюгаты аминогликозидов, такие как нео-N-акридин, нео-S-акридин, нео-C-акридин, тобра-N-акридин и КанаА-N-акридин. Использование аналога акридина может повысить специфичность последовательности. Например, неомицин В имеет высокую аффинность к РНК по сравнению с ДНК, но низкую специфичность к последовательности. Аналог акридина, нео-5-акридин, обладает повышенной аффинностью к элементу HIV Rev-ответа (RRE). В некоторых вариантах осуществления, гуанидиновый аналог (гуанидиногликозид) аминогликозидного лиганда связан с агентом сайленсинга РНК. В гуанидиногликозиде, аминокислотная группа заменена на гуанидиновую группу. Присоединение аналога гуанидина может усилить клеточную проницаемость агента сайленсинга РНК. Связанный лиганд может представлять собой полиаргининовый пептид, пептоид или пептидомиметик, который может усиливать поглощение клетками олигонуклеотидного агента.

Типовые лиганды связаны, как правило, ковалентно, прямо или косвенно через промежуточную связь с носителем, конъюгированным с лигандом. В типовых вариантах осуществления, лиганд присоединен к носителю посредством промежуточной привязи. В типовых вариантах осуществления, лиганд изменяет распределение, таргетирование или время жизни агента сайленсинга РНК, в который он включен. В типовых вариантах осуществления, лиганд обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, например, по сравнению с видами без такого лиганда.

Типовые лиганды могут улучшать свойства транспорта, гибридизации и специфичности, а также могут улучшать нуклеазную резистентность полученного природного или модифицированного агента сайленсинга РНК или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в настоящем документе, и/или природные или модифицированные рибонуклеотиды. Лиганды в целом могут включать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для мониторинга распределения; поперечно сшивающие агенты; группы, придающие нуклеазную резистентность; и природные или необычные нуклеотидные основания. Общие примеры включают липофилы, липиды, стероиды (например, уваол, гецигенин, диосгенин), терпены (например, тритерпены, например, сарсасапогенин, фриделин, производное эпифриделанола литохоловой кислоты), витамины (например, фолиевую кислоту, витамин А, биотин, пиридоксаль), углеводы, белки, агенты, связывающие белок, молекулы, таргетирующие интегрин, поликатионные соединения, пептиды, полиамины и пептидные миметики. Лиганды могут включать вещества, существующие в природе (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или

глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); аминокислоту или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола-малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактид-со-гликоль), сополимер дивинилового эфира-малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать таргетные группы, например таргетный агент для клетки или ткани, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Таргетная группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин или RGD пептид или RGD пептидный миметик. Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины и замещенные акридины), поперечно-сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин, фенантролин, пирены), lys-tyr-lys трипептид, аминогликозиды, аминогликозиды гуанидиния, искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин (и его тиоаналоги), холевую кислоту, холановую кислоту, литохолевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, глицерин (например, сложные эфиры (например, моно-, бис- или трис-эфиры жирных кислот, например, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ или C₂₀ жирные кислоты) и их простые эфиры, например, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ или C₂₀ алкил, например, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, 1,3-бис-О(октадецил)глицерин), геранилксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадециловую группу, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту (например, глицерилдистеарат), олеиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и конъюгаты пептидов (например, пептид сложного локуса, в котором

локализованы гомеозисные мутации, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислоты, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченные маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилители транспорта/абсорбции (например, аспирин, напроксен, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, акридин-имидазольные конъюгаты, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут быть белками, например, гликопротеинами или пептидами, например, молекулами, обладающими специфическим сродством к ко-лиганду, или антителами, например, антителом, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды могут также включать гормоны и гормональные рецепторы. Они также могут включать не пептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор p38 MAP киназы или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например лекарственное средство, которое может увеличить поглощение агента сайленсинга РНК клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин. Лиганд может увеличить поглощение агента сайленсинга РНК, клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Примеры лигандов, которые могли бы иметь такой эффект, включают фактор некроза опухоли альфа (TNFα), интерлейкин-1 бета или гамма-интерферон.

В одном аспекте лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида обычно связывается с белком сыворотки, например альбумином сыворотки человека (HSA). Лиганд, связывающий HSA, обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в не почечной ткани-мишени. Например, тканью-мишенью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также могут быть использованы в качестве лигандов. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать резистентность конъюгата к деградации, (b) усиливать таргетирование или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (с) может использоваться для регулирования связывания с белком сыворотки, например, HSA. Лиганд на основе липида можно использовать для модулирования, например, контроля связывания конъюгата с тканью-мишенью. В конкретном варианте осуществления, лиганд на основе липида связывает HSA. Однако желательно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы нельзя было обратить

связывание HSA-лиганда. В другом типовом варианте осуществления, лиганд на основе липида слабо связывает HSA или вообще не связывает его.

В другом аспекте лиганд представляет собой группу, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно полезны для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например злокачественного или не злокачественного типа, например раковых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е и К. Другие примеры витаминов включают витамин В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеины низкой плотности (LDL).

В другом аспекте, лиганд представляет собой проникающий в клетку агент, обычно спиральный проникающий в клетку агент. В некоторых типовых вариантах осуществления, агент является амфипатическим. Типовой агент представляет собой пептид, такой как tat или сложный локус, в котором локализованы гомеозисные мутации. Если агент представляет собой пептид, его можно модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертомеры, не пептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральный агент обычно представляет собой альфа-спиральный агент, который обычно имеет липофильную поверхность и липофобную поверхность.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептидов и пептидомиметиков к олигонуклеотидным агентам может влиять на фармакокинетическое распределение агента сайленсинга РНК, например, за счет усиления клеточного распознавания и абсорбции. Пептид или пептидомиметический фрагмент может иметь длину примерно 5-50 аминокислот, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептид или пептидомиметик может быть, например, проникающим в клетку пептидом, катионным пептидом, амфипатическим пептидом или гидрофобным пептидом (например, состоящим в основном из Tyr, Trp или Phe). Пептидная группа может представлять собой дендримерный пептид, пептид с ограниченной конформационной свободой или поперечно-сшитый пептид. Пептидная группа может представлять собой L-пептид или D-пептид. В другом альтернативном варианте, пептидная группа может включать гидрофобную последовательность транслокации мембраны (MTS). Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки «one-bead-one-compound» (OBOC) (Lam et al., Nature 354:82-84, 1991). В типовых вариантах осуществления, пептид или пептидомиметик, связанный с агентом сайленсинга РНК посредством введенного мономерного звена, представляет собой пептид, таргетирующий клетку, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота

(RGD) или миметик RGD. Длина пептидной части может варьироваться от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные группы могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или непосредственных конформационных свойств. Любая из структурных модификаций, описанных ниже, может быть использована.

6) Гидрофобные группы

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечных РНК, представленных в настоящем документе, молекула РНК конъюгирована с одной или несколькими гидрофобными группами (см. публикацию РСТ № WO 2018/031933, которая включена в настоящий документ посредством ссылки). В одном варианте осуществления, гидрофобная группа обладает аффинностью к липопротеину низкой плотности и/или липопротеину промежуточной плотности. В родственном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой насыщенную или ненасыщенную группу, содержащую менее трех двойных связей.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа имеет аффинность к липопротеину высокой плотности. В родственном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой полиненасыщенную группу, имеющую три или несколько двойных связей (например, имеющую три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять двойных связей). В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой полиненасыщенную группу, имеющую три двойные связи. В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой полиненасыщенную группу, имеющую четыре двойные связи. В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой полиненасыщенную группу, имеющую пять двойных связей. В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой полиненасыщенную группу, имеющую шесть двойных связей.

В другом варианте гидрофобная группа выбрана из группы, состоящей из жирных кислот, стероидов, секостероидов, липидов, ганглиозидов и нуклеозидных аналогов и эндоканнабиноидов.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой нейромодуляторный липид, например эндоканнабиноид. Неограничивающие примеры эндоканнабиноидов включают: анандамид, арахидоноилэтаноламин, 2-арахидонилглицерилэфир (ноладиновый эфир), 2-арахидонилглицерилэфир (ноладиновый эфир), 2-арахидоноилглицерин и N-арахидоноилдофамин.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой омега-3 жирную кислоту. Неограничивающие примеры омега-3 жирных кислот включают, но не ограничены ими: гексадекатриеновую кислоту (HTA), альфа-линоленовую кислоту (ALA), стеарионовую кислоту (SDA), эйкозатриеновую кислоту (ETE), эйкозатетраеновую кислоту (ETA), эйкозапентаеновую кислоту (EPA, тимнодовую кислоту), генейкозапентаеновую кислоту (HPA), докозапентаеновую кислоту (DPA, клюпаноновую кислоту), докозагексаеновую кислоту (DHA, цервоновую кислоту), тетракозапентаеновую

кислоту и тетракозагексаеновую кислоту (низиновую кислоту).

В другом варианте осуществления, гидрофобный фрагмент представляет собой омега-6 жирную кислоту. Неограничивающие примеры омега-6 жирных кислот включают, но не ограничиваются ими: линолеовую кислоту, гамма-линоленовую кислоту (ГЛК), эйкозодиеновую кислоту, дигомо-гамма-линоленовую кислоту (ДГЛК), арахидоновую кислоту (АК), докозодиеновую кислоту., аденовая кислота, докозапентаеновая кислота (осбондовая кислота), тетракозатетраеновая кислота и тетракозапентаеновая кислота.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой омега-9 жирную кислоту. Неограничивающие примеры омега-9 жирных кислот включают, но не ограничены ими: олеиновую кислоту, эйкозеновую кислоту, кислоту Мида, эруковую кислоту и нервоновую кислоту.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой конъюгированную линоленовую кислоту. Неограничивающие примеры конъюгированных линоленовых кислот включают, но не ограничены ими: α -календиновую кислоту, β -календиновую кислоту, жакаровую кислоту, α -элеостеариновую кислоту, β -элеостеариновую кислоту, катальпиновую кислоту и пунициновую кислоту.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой насыщенную жирную кислоту. Неограничивающие примеры насыщенных жирных кислот включают, но не ограничены ими: каприловую кислоту, каприновую кислоту, докозановую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидиновую кислоту, бегеновую кислоту, лигноцериновую кислоту и церотовую кислоту.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой кислоту, выбранную из группы, состоящей из: румеленовой кислоты, α -паринаровой кислоты, β -паринаровой кислоты, босепентаеновой кислоты, пиноленовой кислоты и подокарпиновой кислоты.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа выбрана из группы, состоящей из: докозановой кислоты (DCA), докозагексаеновой кислоты (DHA) и эйкозапентаеновой кислоты (EPA). В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой докозановую кислоту (DCA). В другом конкретном варианте осуществления, гидрофобная часть представляет собой DHA. В другом конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой EPA.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой секостероид. В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой кальциферол. В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой стероид, отличный от холестерина.

В конкретном варианте осуществления, гидрофобная группа не является холестерином.

В другом варианте осуществления, гидрофобная группа представляет собой алкильную цепь, витамин, пептид или биоактивный конъюгат, включая, но не

ограничиваясь ими: гликофинголипиды, полиненасыщенные жирные кислоты, секостероиды, стероидные гормоны или стероловые липиды.

В одном варианте осуществления, двухцепочечная РНК, представленная в настоящем документе, содержит один или несколько химически модифицированных нуклеотидов. В конкретном варианте осуществления, двухцепочечная РНК содержит чередующиеся 2'-метоксинуклеотиды и 2'-фторнуклеотиды. В другом конкретном варианте осуществления, один или несколько нуклеотидов двухцепочечной РНК соединены с соседними нуклеотидами через фосфотриатные связи. В некоторых вариантах осуществления дсРНК, описанных в настоящем документе, нуклеотид с нарушением комплементарности и нуклеотид(ы), соседние с нуклеотидом с нарушением комплементарности, представляют собой 2'-метоксирибонуклеотиды.

В другом конкретном варианте осуществления, нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 3' конца двухцепочечной РНК по настоящему изобретению соединены с соседними нуклеотидами посредством фосфотриатных связей. В еще одном конкретном варианте осуществления, нуклеотиды в положениях 1 и 2 с 3' конца двухцепочечной РНК и нуклеотиды в положениях 1 и 2 от 5' конца двухцепочечной РНК соединены с соседними нуклеотидами через фосфотриатные связи.

В одном варианте осуществления двухцепочечной РНК, первый олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, 16 последовательных нуклеотидов, 5' конец, 3' конец и имеет комплементарность к мишени, где:

(1) первый олигонуклеотид содержит чередующиеся 2'-метоксинуклеотиды и 2'-фторнуклеотиды;

(2) нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5' конца не являются 2'-метоксинуклеотидами;

(3) нуклеотиды соединены фосфодиэфирными или тиофосфатными связями; и

(4) нуклеотиды в положениях 1-6 от 3' конца или в положениях 1-7 от 3' конца соединены с соседними нуклеотидами через тиофосфатные связи.

7) Усовершенствованный паттерн стабилизации

В одном варианте осуществления двухцепочечных РНК, представленных в настоящем документе:

(1) первый олигонуклеотид содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фтор-рибонуклеотиды, где каждый нуклеотид представляет собой 2'-метоксирибонуклеотид или 2'-фтор-рибонуклеотид; и нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5' конца первого олигонуклеотида не являются 2'-метоксирибонуклеотидами;

(2) второй олигонуклеотид содержит чередующиеся 2'-метоксирибонуклеотиды и 2'-фтор-рибонуклеотиды, где каждый нуклеотид представляет собой 2'-метоксирибонуклеотид или 2'-фтор-рибонуклеотид; и нуклеотиды в положениях 2 и 14 от 5' конца второго олигонуклеотида представляют собой 2'-метоксирибонуклеотиды;

(3) нуклеотиды первого олигонуклеотида соединены с соседними нуклеотидами через фосфодиэфирные или тиофосфатные связи, при этом нуклеотиды в положениях 1-6

с 3' конца или в положениях 1-7 с 3' конца соединены с соседними нуклеотидами через тиофосфатные связи; и

(4) нуклеотиды второго олигонуклеотида соединены с соседними нуклеотидами через фосфодиэфирные или тиофосфатные связи, при этом нуклеотиды в положениях 1 и 2 с 3' конца соединены с соседними нуклеотидами через тиофосфатные связи.

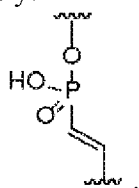
В одном варианте осуществления двухцепочечной РНК, первый олигонуклеотид содержит на 3-7 рибонуклеотидов больше, чем второй олигонуклеотид.

В одном варианте осуществления, двухцепочечная РНК содержит дуплексы из 11-16 пар оснований, где нуклеотиды каждого дуплекса пар оснований имеют разные химические модификации (например, один нуклеотид имеет 2'-фтор модификацию, и другой нуклеотид имеет 2'-метокси).

В одном варианте двухцепочечной РНК, первый олигонуклеотид содержит на 3-7 рибонуклеотидов больше, чем второй олигонуклеотид. В другом варианте осуществления.

В одном варианте осуществления, первый олигонуклеотид представляет собой антисмысловую цепь, и второй олигонуклеотид представляет собой смысловую цепь. См. публикацию РСТ № WO 2016/161388, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления, первый или второй олигонуклеотид содержит одну или несколько межсубъединичных модификаций VP, имеющих следующую формулу:



8) Разветвленные олигонуклеотиды

Два или несколько агентов сайленсинга РНК, как описано выше, например олигонуклеотидные конструкции, такие как миРНК, могут быть соединены друг с другом с помощью одной или нескольких групп, независимо выбранных из линкера, спейсера и точек ветвления, образуя разветвленный олигонуклеотид, содержащий два или несколько агентов сайленсинга РНК. ФИГ. 31 иллюстрирует типовой разветвленный каркас ди-миРНК для доставки двух миРНК. В типовых вариантах осуществления, каждая нуклеиновая кислота разветвленного олигонуклеотида содержит антисмысловую цепь (или ее части), где антисмысловая цепь имеет достаточную комплементарность к гетерозиготному однонуклеотидному полиморфизму для опосредования РНК-опосредованного механизма сайленсинга (например, РНКи). В других вариантах осуществления, предложен второй тип разветвленных олигонуклеотидов, содержащих нуклеиновые кислоты, которые содержат смысловую цепь (или ее части) для сайленсинга антисмысловых транскриптов, где смысловая цепь имеет достаточную комплементарность к антисмысловому транскрипту для опосредования РНК-опосредованного механизма сайленсинга. В дополнительных вариантах осуществления,

предложен третий тип разветвленных олигонуклеотидов, содержащий нуклеиновые кислоты обоих типов, то есть нуклеиновую кислоту, содержащую антисмысловую цепь (или ее части), и олигонуклеотид, содержащий смысловую цепь (или ее части).

В типовых вариантах осуществления, разветвленные олигонуклеотиды могут иметь от двух до восьми агентов сайленсинга РНК, присоединенных через линкер. Линкер может быть гидрофобным. В конкретном варианте осуществления, разветвленные олигонуклеотиды по настоящей заявке содержат от двух до трех олигонуклеотидов. В одном варианте осуществления, олигонуклеотиды независимо имеют существенную химическую стабилизацию (например, по меньшей мере, 40% составляющих оснований являются химически модифицированными). В конкретном варианте осуществления, олигонуклеотиды имеют полную химическую стабилизацию (т.е. все составляющие основания химически модифицированы). В некоторых вариантах осуществления, разветвленные олигонуклеотиды содержат один или несколько одноцепочечных хвостов, содержащих фосфоротиоат, каждый из которых независимо содержит от двух до двадцати нуклеотидов. В конкретном варианте осуществления, каждый одноцепочечный хвост содержит от восьми до десяти нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, разветвленные олигонуклеотиды характеризуются тремя свойствами: (1) разветвленной структурой, (2) полной метаболической стабилизацией и (3) наличием одноцепочечного хвоста, содержащего фосфоротиоатные линкеры. В конкретном варианте осуществления, разветвленные олигонуклеотиды имеют 2 или 3 ответвления. Считается, что увеличенный общий размер разветвленных структур способствует повышенному поглощению. Кроме того, без привязки к конкретной теории активности считается, что несколько соседних ветвей (например, 2 или 3) позволяют каждой ветви действовать сообща и, таким образом, значительно повышают скорость интернализации, миграции и высвобождения.

Разветвленные олигонуклеотиды представлены в различных структурно разных вариантах осуществления. Как показано на ФИГ. 36, например, в некоторых вариантах осуществления, нуклеиновые кислоты, присоединенные к точкам ветвления, являются одноцепочечными и состоят из ингибиторов микроРНК, гэдмеров, миксмеров, SSO, РМО или РНА. Эти отдельные цепи могут быть присоединены к их 3' или 5' концу. Комбинации микроРНК и одноцепочечных олигонуклеотидов также можно использовать для выполнения двойной функции. В другом варианте осуществления, короткие нуклеиновые кислоты, комплементарные гэдмерам, миксмерам, ингибиторам микроРНК, SSO, РМО и РНА, используются для переноса этих активных одноцепочечных нуклеиновых кислот и улучшения распределения и интернализации в клетке. Короткая дуплексная область имеет низкую температуру плавления ($T_m \sim 37^\circ\text{C}$) для быстрой диссоциации при интернализации разветвленной структуры в клетку.

Как показано на ФИГ. 37, разветвленные олигонуклеотиды ди-микроРНК могут содержать химически разные конъюгаты. Конъюгированные биоактивные лиганды могут быть использованы для повышения клеточной специфичности и стимулирования

мембранной ассоциации, интернализации и связывания с белками сыворотки. Примеры биологически активных групп, которые можно использовать для конъюгации, включают DNAg2, DNA, GalNAc и холестерин. Эти фрагменты могут быть присоединены к ДимирНК либо через соединительный линкер или спейсер, либо добавлены через дополнительный линкер или спейсер, прикрепленный к другому свободному концу миРНК.

Наличие разветвленной структуры улучшает уровень удержания в ткани в головном мозге более чем в 100 раз по сравнению с не разветвленными соединениями с идентичной химической композицией, что предполагает новый механизм клеточного удержания и распределения. Разветвленные олигонуклеотиды неожиданно равномерно распределены по всему спинному и головному мозгу. Более того, разветвленные олигонуклеотиды демонстрируют неожиданно эффективную системную доставку в различные ткани и очень высокие уровни накопления в тканях.

Разветвленные олигонуклеотиды содержат множество терапевтических нуклеиновых кислот, включая ASO, микроРНК, ингибиторы микроРНК, сплайс-переключение, РМО, РНА. В некоторых вариантах осуществления, разветвленные олигонуклеотиды дополнительно содержат конъюгированные гидрофобные группы и демонстрируют беспрецедентный сайленсинг активности и эффективность *in vitro* и *in vivo*.

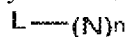
Линкеры

В варианте осуществления разветвленного олигонуклеотида, каждый линкер независимо выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций; где любой атом углерода или кислорода линкера необязательно заменен атомом азота, несет гидроксильный заместитель или несет оксо заместитель. В одном варианте осуществления, каждый линкер представляет собой этиленгликолевую цепь. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой алкильную цепь. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой пептид. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой РНК. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой ДНК. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой фосфат. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой фосфонат. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой фосфорамидат. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой сложный эфир. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой амид. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой триазол. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой структуру, выбранную из формул на ФИГ. 37.

9) Соединение формулы (I)

В другом аспекте, в настоящем документе представлено разветвленное

олигонуклеотидное соединение формулы (I):



(I)

где L выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций, где формула (I) необязательно дополнительно содержит одну или несколько точек ветвления В и один или несколько спейсеров S; где В независимо в каждом случае представляет собой поливалентное органическое соединение или его производное; S независимо в каждом случае выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций; N представляет собой РНК-дуплекс, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна области гена, содержащего аллельный полиморфизм, где антисмысловая цепь содержит: нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении 2-7 от 5' конца, который комплементарен аллельному полиморфизму; и нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), расположенный в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP, который представляет собой нарушение комплементарности с нуклеотидом в гене. В типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 2, 4 или 6 от 5' конца, и нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM) расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

Каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо содержит одну или несколько химических модификаций; и n равно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) имеет структуру, выбранную из формул (I-1)-(I-9) Таблицы 1.

Таблица 1

$\text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N}$ (I-1)	$\text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{L} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N}$ (I-2)	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \\ \text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N} \end{array}$ (I-3)
$\begin{array}{c} \text{N} \\ \\ \text{N} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{N} \\ \\ \text{N} \end{array}$ (I-4)	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \end{array}$ (I-5)	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ (I-6)
$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ (I-7)	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ (I-8)	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{N} \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{N} \end{array}$ (I-9)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-1). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-2). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-3). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-4). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-5). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-6). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-7). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-8). В другом варианте осуществления, соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (I-9).

В варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер независимо выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций; где любой атом углерода или кислорода линкера необязательно заменен атомом азота, несет гидроксильный заместитель или несет оксо заместитель. В одном варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой этиленгликолевую цепь. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой алкильную цепь. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой пептид. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой РНК. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой ДНК. В другом варианте осуществления соединения

формулы (I), каждый линкер представляет собой фосфат. В другом варианте осуществления, каждый линкер представляет собой фосфонат. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой фосфорамидат. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой сложный эфир. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой амид. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой триазол. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), каждый линкер представляет собой структуру, выбранную из формул на ФИГ. 36 и ФИГ. 38.

В одном варианте осуществления соединения формулы (I), В представляет собой поливалентное органическое соединение. В другом варианте осуществления соединения формулы (I), В представляет собой производное поливалентного органического вещества. В одном варианте осуществления соединения формулы (I), В представляет собой производное триола или тетрола. В другом варианте осуществления, В представляет собой производное три- или тетракарбоновой кислоты. В другом варианте осуществления, В представляет собой производное амина. В другом варианте осуществления, В представляет собой производное три- или тетрамина. В другом варианте осуществления, В представляет собой производное аминокислоты. В другом варианте осуществления соединения формулы (I) В выбран из формул на ФИГ. 38.

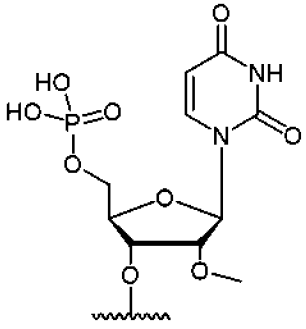
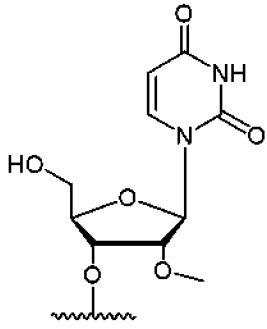
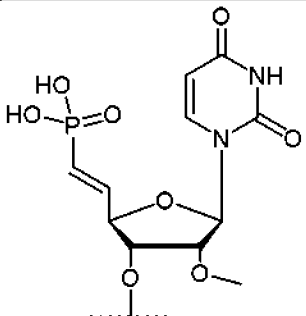
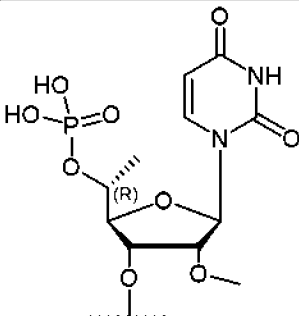
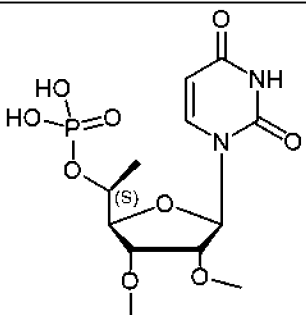
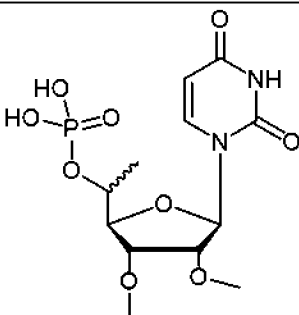
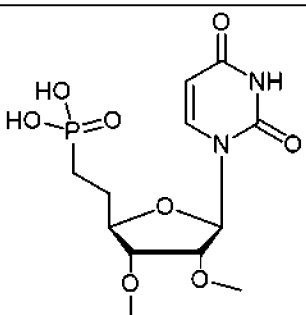
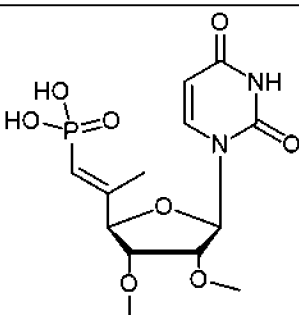
Поливалентные органические частицы представляют собой группы, содержащие углерод и три или несколько валентностей (т.е. точек присоединения с группами, такими как S, L или N, как определено выше). Неограничивающие примеры поливалентных органических соединений включают триолы (например, глицерин, флороглуцин и подобные), тетролы (например, рибозу, пентаэритрит, 1,2,3,5-тетрагидроксibenзол и подобные), трикарбоновые кислоты (например, лимонную кислоту, 1,3,5-циклогексантрикарбоновую кислоту, тримезиновую кислоту и подобные), тетракарбоновые кислоты (например, этилендиаминтетрауксусную кислоту, пиромеллитовую кислоту и подобные), третичные амины (например, трипропаргиламин, триэтанолламин и подобные), триамины (например, диэтилентриамин и подобные), тетрамины и частицы, содержащие комбинацию гидроксильных, тиольных, амино- и/или карбоксильных групп (например, аминокислоты, такие как лизин, серин, цистеин и подобные).

В варианте осуществления соединения формулы (I), каждая нуклеиновая кислота содержит один или несколько химически модифицированных нуклеотидов. В варианте осуществления соединения формулы (I), каждая нуклеиновая кислота состоит из химически модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы (I) >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% каждой нуклеиновой кислоты содержит химически модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления, каждая антисмысловая цепь независимо

содержит 5' концевую группу R, выбранную из групп, указанных в Таблице 2:

Таблица 2

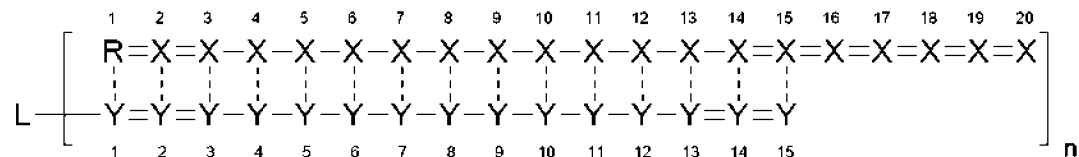
 R^1	 R^2
 R^3	 R^4
 R^5	 R^6
 R^7	 R^8

В одном варианте осуществления, R представляет собой R_1 . В другом варианте осуществления, R представляет собой R_2 . В другом варианте осуществления, R представляет собой R_3 . В другом варианте осуществления, R представляет собой R_4 . В другом варианте осуществления, R представляет собой R_5 . В другом варианте

осуществления, R представляет собой R₆. В другом варианте осуществления, R представляет собой R₇. В другом варианте осуществления, R представляет собой R₈.

Структура формулы (II)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) имеет структуру формулы (II):



(II)

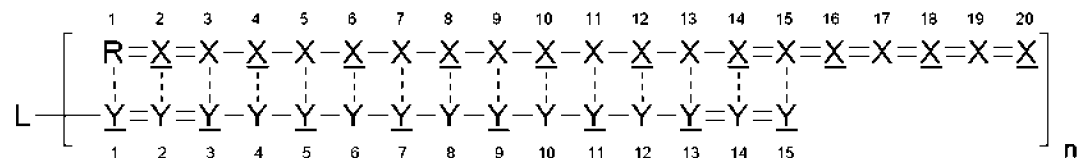
где X в каждом случае независимо выбран из аденозина, гуанозина, уридина, цитидина и их химически модифицированных производных; Y в каждом случае независимо выбран из аденозина, гуанозина, уридина, цитидина и их химически модифицированных производных; - представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь; = представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь; и --- представляет, индивидуально для каждого случая, взаимодействие спаривания оснований или нарушение комплементарности.

В определенных вариантах осуществления, структура формулы (II) не содержит нарушений комплементарности. В одном варианте осуществления, структура формулы (II) содержит 1 нарушение комплементарности. В другом варианте соединения формулы (II) содержит 2 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (II) содержит 3 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (II) содержит 4 нарушения комплементарности. В варианте осуществления, каждая нуклеиновая кислота состоит из химически модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% X в структуре формулы (II) представляют собой химически модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления, >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% X в структуре формулы (II) представляют собой химически модифицированные нуклеотиды.

Структура формулы (III)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) имеет структуру формулы (III):



(III)

где X в каждом случае независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-дезоксид-2'-фтор; X независимо в каждом случае представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-О-метил; Y независимо в каждом случае

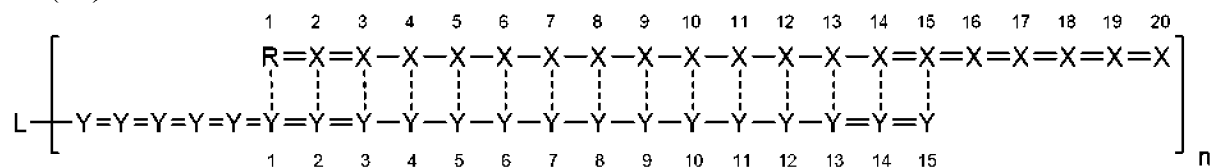
представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-дезоксигидрокси-2'-фтор; и Y в каждом случае независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-О-метил.

В одном варианте осуществления, X выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксигидрокси-2'-фтор модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, X выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, Y выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксигидрокси-2'-фтор модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, Y выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина.

В определенных вариантах осуществления, структура формулы (III) не содержит нарушений комплементарности. В одном варианте осуществления, структура формулы (III) содержит 1 нарушение комплементарности. В другом варианте соединения формулы (III) содержит 2 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (III) содержит 3 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (III) содержит 4 нарушения комплементарности.

Структура формулы (IV)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) имеет структуру формулы (IV):



(IV)

где X в каждом случае независимо выбран из аденозина, гуанозина, уридина, цитидина и их химически модифицированных производных; Y в каждом случае независимо выбран из аденозина, гуанозина, уридина, цитидина и их химически модифицированных производных; - представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь; = представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь; и --- представляет собой, индивидуально для каждого случая, взаимодействие спаривания оснований или нарушение комплементарности.

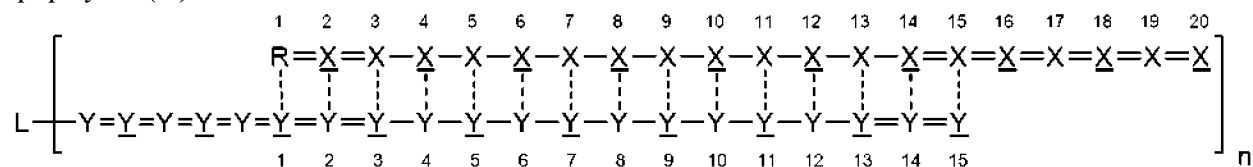
В некоторых вариантах осуществления, структура формулы (IV) не содержит нарушений комплементарности. В одном варианте осуществления, структура формулы (IV) содержит 1 нарушение комплементарности. В другом варианте соединения формулы (IV) содержит 2 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (IV) содержит 3 нарушения комплементарности. В другом варианте соединения формулы (IV) содержит 4 нарушения комплементарности. В варианте осуществления, каждая нуклеиновая кислота состоит из химически модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% X в структуре формулы (II) представляют собой химически

модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления, >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% X в структуре формулы (II) представляют собой химически модифицированные нуклеотиды.

Структура формулы (V)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I) имеет структуру формулы (V):



(V)

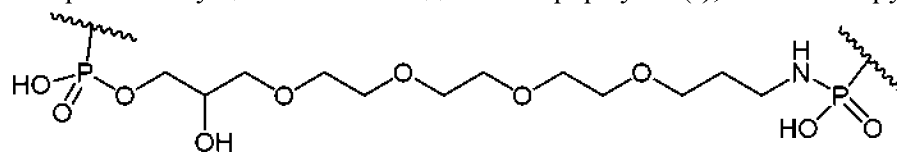
где X в каждом случае независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-дезоксид-2'-фтор; X независимо в каждом случае представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-О-метил; Y независимо в каждом случае представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-дезоксид-2'-фтор; и Y в каждом случае независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию 2'-О-метил.

В некоторых вариантах осуществления, X выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, X выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, Y выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина. В одном варианте осуществления, Y выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил модифицированного аденозина, гуанозина, уридина или цитидина.

В некоторых вариантах осуществления, структура формулы (V) не содержит нарушений комплементарности. В одном варианте осуществления, структура формулы (V) содержит 1 нарушение комплементарности. В другом варианте осуществления, структура формулы (V) содержит 2 нарушения комплементарности. В другом варианте осуществления, структура формулы (V) содержит 3 нарушения комплементарности. В другом варианте осуществления, структура формулы (V) содержит 4 нарушения комплементарности.

Переменные линкеры

В варианте осуществления соединения формулы (I), L имеет структуру L1:



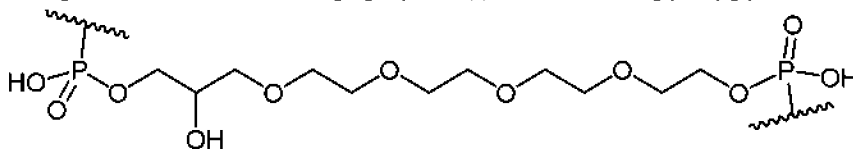
(L1)

В варианте осуществления L1, R представляет собой R³ и n равен 2.

В варианте осуществления структуры формулы (II), L имеет структуру L1. В

варианте осуществления структуры формулы (III), L имеет структуру L1. В варианте осуществления структуры формулы (IV), L имеет структуру L1. В варианте осуществления структуры формулы (V), L имеет структуру L1. В варианте осуществления структуры формулы (VI), L имеет структуру L1. В варианте осуществления структуры формулы (VI), L имеет структуру L1.

В варианте соединения формулы (I), L имеет структуру L2:

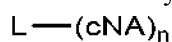


(L2)

В варианте осуществления L2, R представляет собой R^3 и n равно 2. В варианте осуществления структуры формулы (II), L имеет структуру L2. В варианте осуществления структуры формулы (III), L имеет структуру L2. В варианте осуществления структуры формулы (IV), L имеет структуру L2. В варианте осуществления структуры формулы (V) L имеет структуру L2. В варианте осуществления структуры формулы (VI), L имеет структуру L2. В варианте осуществления структуры формулы (VI), L имеет структуру L2.

10) Система доставки

В еще одном аспекте, в настоящем документе представлена система доставки терапевтических нуклеиновых кислот, имеющая структуру формулы (VI):



(VI)

где L выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций, где формула (VI) необязательно дополнительно содержит одну или несколько точек ветвления В и один или несколько спейсеров S; где В независимо, в каждом случае, представляет собой поливалентное органическое соединение или его производное; S независимо в каждом случае выбран из этиленгликолевой цепи, алкильной цепи, пептида, РНК, ДНК, фосфата, фосфоната, фосфорамидата, сложного эфира, амида, триазола и их комбинаций; каждая cNA независимо представляет собой нуклеиновую кислоту-носитель, включающую одну или несколько химических модификаций; и n равно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

В одном варианте осуществления системы доставки, L представляет собой этиленгликолевую цепь. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой алкильную цепь. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой пептид. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой РНК. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой ДНК. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой фосфат. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой фосфонат. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой фосфорамидат. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой сложный эфир. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой амид. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой триазол. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой комбинацию из двух или более из вышеперечисленного.

доставки, L представляет собой фосфорамидат. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой сложный эфир. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой амид. В другом варианте осуществления системы доставки, L представляет собой триазол.

В одном варианте осуществления системы доставки, S представляет собой этиленгликолевую цепь. В другом варианте осуществления, S представляет собой алкильную цепь. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой пептид. В другом варианте осуществления, S представляет собой РНК. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой ДНК. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой фосфат. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой фосфонат. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой фосфорамидат. В другом варианте осуществления системы доставки, S представляет собой сложный эфир. В другом варианте S представляет собой амид. В другом варианте осуществления, S представляет собой триазол.

В одном варианте осуществления системы доставки, n равно 2. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 3. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 4. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 5. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 5. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 6. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 7. В другом варианте осуществления системы доставки, n равно 8.

В некоторых вариантах осуществления, каждая cNA содержит >95%, >90%, >85%, >80%, >75%, >70%, >65%, >60%, >55% или >50% химически модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) имеет структуру, выбранную из формул (VI-1)-(VI-9) таблицы 3:

Таблица 3

$\text{ANc} \text{---} \text{L} \text{---} \text{cNA}$ (VI-1)	$\text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{L} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA}$ (VI-2)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \\ \\ \text{ANc} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{cNA} \end{array}$ (VI-3)
$\begin{array}{c} \text{cNA} \\ \\ \text{ANc} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{cNA} \\ \\ \text{cNA} \end{array}$ (VI-4)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA} \end{array}$ (VI-5)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \\ \\ \text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA} \\ \\ \text{cNA} \end{array}$ (VI-6)
$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA} \\ \quad \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-7)	$\begin{array}{c} \text{cNA} \quad \text{cNA} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA} \\ \quad \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-8)	$\begin{array}{c} \text{ANc} \quad \text{cNA} \\ \quad \\ \text{S} \quad \text{S} \\ \quad \\ \text{ANc} \text{---} \text{S} \text{---} \text{B} \text{---} \text{L} \text{---} \text{B} \text{---} \text{S} \text{---} \text{cNA} \\ \quad \\ \text{cNA} \quad \text{cNA} \end{array}$ (VI-9)

В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-1). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-2). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-3). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-4). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-5). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-6). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-7). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-8). В одном варианте осуществления, соединение формулы (VI) представляет собой структуру формулы (VI-9).

В одном варианте осуществления, соединение формул (VI) (включая, например, формулы (VI-1)-(VI-9), каждая cNA независимо содержит, по меньшей мере, 15 непрерывных нуклеотидов. В одном варианте осуществления, каждая cNA независимо состоит из химически- модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления, система доставки дополнительно содержит n терапевтических нуклеиновых кислот (NA), где каждая NA содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна области гена, содержащей аллельный полиморфизм, где антисмысловая цепь содержит: нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении 2-7 от 5' конца, комплементарный аллельному полиморфизму; и нуклеотид в положении нарушения комплементарности

(MM), расположенный в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP, которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене. В типовых вариантах осуществления, нуклеотид в положении SNP находится в положении 2, 4 или 6 от 5' конца, и нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM) расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP. Кроме того, каждая NA гибридизуется, по меньшей мере, с одной сNA. В одном варианте осуществления, система доставки состоит из 2 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 3 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 4 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 5 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 6 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 7 NA. В другом варианте осуществления, система доставки состоит из 8 NA.

В одном варианте осуществления, каждая NA независимо содержит, по меньшей мере, 16 последовательных нуклеотидов. В одном варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 16-20 непрерывных нуклеотидов. В одном варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 16 непрерывных нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 17 непрерывных нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 18 непрерывных нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 19 непрерывных нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо содержит 20 непрерывных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления, каждая NA содержит неспаренный липкий конец, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA содержит неспаренный липкий конец, по меньшей мере, из 3 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA содержит неспаренный липкий конец, по меньшей мере, из 4 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA содержит неспаренный липкий конец, по меньшей мере, из 5 нуклеотидов. В другом варианте осуществления, каждая NA содержит неспаренный липкий конец, по меньшей мере, из 6 нуклеотидов. В одном варианте осуществления, нуклеотиды липкого конца соединены фосфоротиоатными связями.

В одном варианте осуществления, каждая NA независимо выбрана из группы, состоящей из: ДНК, миРНК, антагомира, микроРНК, гэлмеров, миксмеров или направляющих РНК. В одном варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой ДНК. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой миРНК. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой антагомир. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой микроРНК. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой гэлмер. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой миксмер. В другом варианте осуществления, каждая NA независимо представляет собой направляющую РНК. В варианте осуществления, каждая NA является одной и той же. В варианте осуществления, каждая NA не является одной и той же.

В одном варианте осуществления, система доставки, дополнительно содержащая n терапевтических нуклеиновых кислот (NA), имеет структуру, выбранную из описанных формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 2 терапевтические нуклеиновые кислоты (NA). В другом варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 3 терапевтические нуклеиновые кислоты (NA). В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 4 терапевтические нуклеиновые кислоты (NA). В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 5 терапевтических нуклеиновых кислот (NA). В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 6 терапевтических нуклеиновых кислот (NA). В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 7 терапевтических нуклеиновых кислот (NA). В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) и их вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, дополнительно содержащих 8 терапевтических нуклеиновых кислот (NA).

В одном варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), дополнительно содержащую линкер структуры L1 или L2, где R представляет собой R3 и n равно 2. В другом варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), дополнительно содержащую линкер структуры L1, где R представляет собой R3 и n равно 2. В другом варианте осуществления, система доставки имеет структуру, выбранную из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), дополнительно содержащую линкер структуры L2, где R представляет собой R3 и n равно 2.

Фармацевтические композиции и способы введения

В одном аспекте, в настоящем документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или нескольких соединений, олигонуклеотидов или нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит одну или несколько двухцепочечных химически модифицированных нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, и

фармацевтически приемлемый носитель. В конкретном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит одну двухцепочечную химически модифицированную нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом конкретном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит две двухцепочечные химически модифицированные нуклеиновые кислоты, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном варианте осуществления, фармацевтическая композиция содержит молекулу двухцепочечной РНК, содержащую примерно 15-35 нуклеотидов, комплементарную области гена, кодирующего гетерозиготный мутантный белок SNP, где указанная область содержит аллельный полиморфизм, и вторую цепь, содержащую примерно 15-35 нуклеотидов, комплементарных первой цепи, где молекула дсРНК содержит нарушение комплементарности, которое не находится в положении аллельного полиморфизма; и нарушение комплементарности и нуклеотид, соответствующий полиморфизму, не находятся в центре молекулы дсРНК.

В одном варианте осуществления, нарушение комплементарности находится 4 нуклеотида выше, 3 нуклеотида выше нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, 2 нуклеотида выше нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, 1 нуклеотид выше, 1 нуклеотид ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, 2 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, 3 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, 4 нуклеотида ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, или 5 нуклеотидов ниже нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму. В некоторых вариантах осуществления, нарушение комплементарности не находится рядом с нуклеотидом, соответствующим аллельному полиморфизму.

В другом варианте осуществления фармацевтической композиции, двухцепочечная РНК содержит нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, который находится в положении 2, 3, 4, 5 или 6 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 2 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 3 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 4 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 5 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 6 от 5' конца.

В варианте осуществления фармацевтической композиции, двухцепочечная РНК селективно выключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, например, гетерозиготный SNP. В варианте осуществления фармацевтической композиции,

двухцепочечная РНК исключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и не влияет на аллель дикого типа того же гена. В другом варианте осуществления фармацевтической композиции, двухцепочечная РНК, представленная в настоящем документе, исключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и исключает аллель дикого типа того же гена в меньшей степени, чем мутантный аллель.

Фармацевтическая композиция по описанию составлена таким образом, чтобы быть совместимой с ее предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное (ВВ), внутрикожное, подкожное (ПК или ПК), внутривнутрибрюшинное, внутримышечное, пероральное (например, ингаляцию), чрескожное (местное) и трансмукозальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать кислотами или основаниями, такими как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, подходящие носители включают солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набирать шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и подобными. Во многих случаях желательно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированное

всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено включением в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены введением активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, типовыми способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при определении диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка таких соединений, как правило, должна находиться в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах этого диапазона в зависимости от используемой дозированной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способе по описанию, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить на основе анализов клеточных культур. Доза может быть составлена в животных моделях для получения диапазона концентраций в циркулирующей плазме, который включает EC₅₀ (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальный ответ), как определено в клеточной культуре. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз для человека. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Способы лечения

Настоящее изобретение представляет как профилактические, так и терапевтические способы лечения субъекта, подверженного риску заболевания или нарушения (или предрасположенного к нему), полностью или частично вызванного аллельным полиморфизмом (например, гетерозиготным SNP). В одном варианте осуществления, заболевание или нарушение представляет собой заболевание или нарушение, связанное с тринуклеотидными повторами. В другом варианте осуществления, заболевание или нарушение представляет собой полиглутаминовое нарушение. В одном варианте осуществления, способы включают введение терапевтически эффективного количества молекулы двухцепочечной РНК, представленной в настоящем документе. В одном варианте осуществления, заболевание или нарушение представляет собой нарушение, связанное с экспрессией хантингтина, при котором изменение хантингтина, особенно увеличение числа копий CAG-повтора, приводит к дефекту гена хантингтина (структуры

или функции) или белка хантингтина (структуры, функции или экспрессии), так что клинические проявления включают такие, которые наблюдаются у пациентов с болезнью Хантингтона.

В вариантах осуществления способов, двухцепочечные РНК, описанные в настоящем документе, гомологичны аллельному полиморфизму, за исключением одного олигонуклеотида с нарушением комплементарности в конкретном положении относительно нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму. В некоторых вариантах осуществления, нарушение комплементарности находится в пределах примерно 6 нуклеотидов от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, в пределах примерно 5 нуклеотидов от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, в пределах примерно 4 нуклеотида от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, в пределах примерно 3 нуклеотида от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, в пределах примерно 2 нуклеотида от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму, или в пределах примерно 1 нуклеотида от нуклеотида, соответствующего аллельному полиморфизму. В конкретных типовых вариантах осуществления, нарушение комплементарности не находится рядом с нуклеотидом, соответствующим аллельному полиморфизму.

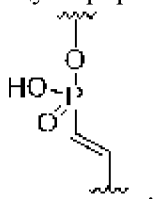
В другом варианте осуществления способов, двухцепочечная РНК содержит нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, который находится в положении 2, 3, 4, 5 или 6 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 2 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 3 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 4 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 5 от 5' конца. В одном варианте осуществления, нуклеотид, соответствующий аллельному полиморфизму, находится в положении 6 от 5' конца.

В варианте осуществления способов, дсРНК содержит нуклеотид, соответствующий полиморфизму в положении 6 от 5' конца и нарушению комплементарности в положении 11 от 5' конца. В варианте осуществления способов, дсРНК содержит нуклеотид, соответствующий полиморфизму в положении 4 от 5' конца и нарушению комплементарности в положении 7 от 5' конца.

В другом варианте осуществления способов двухцепочечная РНК селективно выключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм. В одном варианте осуществления, двухцепочечная РНК выключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и не влияет на аллель дикого типа того же гена. В другом варианте осуществления, двухцепочечная РНК выключает мутантный аллель, имеющий аллельный полиморфизм, и выключает аллель дикого типа того же гена в меньшей степени, чем мутантный аллель.

В одном из вариантов осуществления, способов дсРНК содержит одну или

несколько модификаций межсубъединичной связи VP, где межсубъединичная связь имеет следующую формулу:



В дополнительных вариантах осуществления, дсРНК содержит одну или несколько модификаций межсубъединичных связей, показанных на **ФИГ. 43**.

«Лечение» или «лечить», как используется в настоящем документе, определяется как применение или введение терапевтического агента (например, РНК агента или вектора, или трансгена, кодирующего его) пациенту, или применение или введение терапевтического агента в выделенную ткань или клеточную линию пациента, у которого есть заболевание или нарушение, симптом заболевания или нарушения или предрасположенность к заболеванию или нарушению, с целью излечения, исцеления, облегчения, ослабления, изменения, исправления, облегчения, улучшения или воздействия на заболевание или нарушение, симптомы заболевания или нарушения или предрасположенность к заболеванию.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу профилактики у субъекта заболевания или нарушения, как описано выше, путем введения субъекту терапевтического агента (например, агента РНКи, или вектора, или трансгена, кодирующего их). Субъекты с риском заболевания могут быть идентифицированы, например, с помощью любого или комбинации диагностических или прогностических анализов, как описано в настоящем документе. Введение профилактического средства может происходить до проявления симптомов, характерных для заболевания или нарушения, так что заболевание или нарушение предотвращается или, альтернативно, замедляется его прогрессирование.

Другой аспект изобретения относится к способам терапевтического лечения субъектов, т.е. изменения проявления симптомов заболевания или нарушения. В типовом варианте осуществления, способ модуляции по настоящему изобретению включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей мутант с приобретением функции, с терапевтическим агентом (например, агентом РНКи или вектором или трансгеном, кодирующим его), который специфичен в отношении одной или нескольких последовательностей-мишеней в пределах гена, так что достигается сиквенс-специфичная интерференция с геном. Эти способы можно осуществлять *in vitro* (например, путем культивирования клетки с агентом) или, альтернативно, *in vivo* (например, путем введения агента субъекту).

Агент сайленсинга РНК, модифицированный для повышенного поглощения нервными клетками, можно вводить в стандартной дозе менее примерно 1,4 мг на кг массы тела или менее 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005

или 0,00001 мг на кг массы тела и менее 200 нмоль РНК агента (например, примерно $4,4 \times 10^{16}$ копий) на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075 или 0,00015 нмоль агента сайленсинга РНК на кг массы тела. Стандартную дозу, например, можно вводить путем инъекции (например, внутривенно или внутримышечно, интратекально или непосредственно в головной мозг), ингалируемой дозы или местного применения. В типовых вариантах осуществления, дозы составляют менее 2, 1 или 0,1 мг/кг массы тела.

Доставка агента сайленсинга РНК, непосредственно в орган (например, непосредственно в головной мозг) может осуществляться в дозе порядка от примерно 0,00001 мг до примерно 3 мг на орган или примерно 0,0001-0,001 мг на орган, примерно 0,03-3,0 мг на орган, примерно 0,1-3,0 мг на орган или примерно 0,3-3,0 мг на орган. Дозировка может быть эффективной для лечения или профилактики неврологического заболевания или нарушения (например, болезни Хантингтона). В одном варианте осуществления, стандартную дозу вводят реже, чем один раз в день, например, реже, чем каждые 2, 4, 8 или 30 дней. В другом варианте стандартную дозу не вводят с определенной частотой (например, нерегулярно). Например, стандартную дозу можно вводить однократно. В одном варианте осуществления, эффективную дозу вводят вместе с другими традиционными терапевтическими методами.

В одном варианте осуществления, субъекту вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз агента сайленсинга РНК. Поддерживающая доза или дозы обычно ниже начальной дозы, например, наполовину меньше начальной дозы. Поддерживающая схема может включать лечение субъекта дозой или дозами в диапазоне от 0,01 мкг до 1,4 мг/кг массы тела в сутки, например, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,00001 мг на 1 кг массы тела в сутки. Поддерживающие дозы обычно вводят не чаще одного раза в 5, 10 или 30 дней. Кроме того, схема лечения может продолжаться в течение периода времени, который будет варьироваться в зависимости от природы конкретного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. В конкретных вариантах осуществления, дозу можно вводить не чаще одного раза в сутки, например, не чаще одного раза в 24, 36, 48 или более часов, например, не чаще одного раза в 5 или 8 дней. После лечения, у пациента можно отслеживать изменения его состояния и для облегчения симптомов болезненного состояния. Доза соединения может быть либо увеличена в случае, если пациент не отвечает значительно на текущие уровни дозировки, либо доза может быть уменьшена, если наблюдается облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние было устранено, или если наблюдаются нежелательные побочные эффекты.

Болезнь Хантингтона

В некоторых аспектах изобретения, агенты сайленсинга РНК сконструированы для таргетирования полиморфизмов (например, гетерозиготных однонуклеотидных полиморфизмов) в мутантном белке хантингтине человека (htt) для лечения болезни Хантингтона. Соответственно, в другом аспекте в настоящем документе представлен

способ лечения или контроля над болезнью Хантингтона, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении или контроле, терапевтически эффективного количества соединения, олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение, олигонуклеотид или нуклеиновую кислоту.

Болезнь Хантингтона, наследуемая по аутосомно-доминантному типу, вызывает нарушение когнитивных функций и двигательные заболевания. Пациенты могут прожить более десяти лет с тяжелым истощением, прежде чем умереть от голода или инфекции. Заболевание в большинстве случаев начинается на четвертом или пятом десятилетии жизни, но у части пациентов заболевание проявляется в подростковом возрасте. Генетическая мутация болезни Хантингтона представляет собой удлинённый повтор CAG в гене хантингтина. Количество CAG-повторов варьирует от 8 до 35 копий у нормальных людей (Kremer et al., 1994). Генетическая мутация (например, увеличение длины CAG-повторов от менее 36 в нормальном гене хантингтина до более 36 при заболевании) ассоциирована с синтезом мутантного белка хантингтина, который имеет более 36 последовательных полиглутаминовых остатков (Aronin et al., 1995). Как правило, люди с 36 или более повторами CAG заболевают болезнью Хантингтона. Болезнь Хантингтона, являющаяся прототипом целых двадцати других заболеваний с удлинённым CAG в качестве основной мутации, до сих пор не имеет эффективного лечения. Различные вмешательства, такие как прерывание путей апоптоза, добавление реагентов для повышения эффективности митохондрий и блокада рецепторов NMDA, показали себя многообещающими в клеточных культурах и мышечной модели болезни Хантингтона. Однако, в лучшем случае, эти подходы показывают кратковременное продление выживания клеток или животных.

Ген болезни, связанный с болезнью Хантингтона, называется хантингином или (htt). Локус хантингтина является большим, охватывающим 180 т.п.н. и состоит из 67 экзонов. Ген хантингтина широко экспрессируется и необходим для нормального развития. Он экспрессируется в виде 2 альтернативно полиаденилированных форм, проявляющих различное относительное содержание в различных тканях плода и взрослого человека. Более крупный транскрипт имеет размер примерно 13,7 т.п.н. и экспрессируется преимущественно в мозге взрослых и плода, тогда как меньший транскрипт размером примерно 10,3 т.п.н. экспрессируется более широко. Два транскрипта отличаются своими 3' нетранслируемыми областями (Lin et al., 1993). Предполагается, что оба сообщения кодируют белок массой 348 килодальтон, содержащий 3144 аминокислоты. Считается, что генетический дефект, приводящий к болезни Хантингтона, придает новое свойство мРНК или изменяет функцию белка.

Болезнь Хантингтона соответствует центральной догме генетики: мутантный ген служит матрицей для продуцирования мутантной мРНК; затем мутантная мРНК направляет синтез мутантного белка (Aronin et al., 1995; DiFiglia et al., 1997). Мутантный хантингтин (белок), вероятно, накапливается в селективных нейронах в полосатом теле и

коре головного мозга, нарушает уже установленную клеточную активность и вызывает дисфункцию и гибель нейронов (Aronin et al., 1999; Laforet et al., 2001). Поскольку одной копии мутантного гена достаточно, чтобы вызвать болезнь Хантингтона, самое экономное лечение сделает мутантный ген неэффективным. Теоретические подходы могут включать остановку транскрипции гена мутантного хантингтина, разрушение мутантной мРНК и блокирование трансляции. У каждого один и тот же результат - потеря мутантного хантингтина.

SNP Хантингтона

Типичные SNP в последовательности гена хантингтина, подходящие для таргетирования в соответствии с некоторыми типовыми вариантами осуществления, описаны в **Таблице 4** ниже. Геномную последовательность для каждого сайта SNP можно найти, например, в общедоступной базе данных «SNP Entrez», поддерживаемой NCBI. Частота гетерозиготности для каждого сайта SNP для ДНК пациента с HD и контрольной ДНК дополнительно проиллюстрирована в **Таблице 4**. Таргетирующие комбинации часто гетерозиготных SNP позволяет лечить большую долю людей в популяции с HD с использованием относительно небольшого количества аллель-специфических агентов сайленсинга РНК.

Таблица 4. SNP htt.

rs363125	ORF, экзон 39	11,00%	GTTAAGAGATGGGGACAGTA[A/C]TTCAAC GCTAGAAGAACACA (SEQ ID NO: 1)
rs362273	ORF, экзон 57	35,20%	AGCCACGAGAAGCTGCTGCT[A/G]CAGATC AACCCCGAGCGGGA (SEQ ID NO: 2)
rs362307	3' UTR, экзон 67	48,60%	CCGGAGCCTTTGGAAGTCTG[C/T]GCCCTT GTGCCCTGCCTCCA (SEQ ID NO: 3)
rs362336	ORF, экзон 48	37,40%	CAGCCCGAGCTGCCTGCAGA[A/G]CCGGCG GCCTACTGGAGCAA (SEQ ID NO: 4)
rs362331	ORF, экзон 50	39,40%	CCCACGCCTGCTCCCTCATC[C/T]ACTGTGT GCACTTCATCCTG (SEQ ID NO: 5)
rs362272	ORF, экзон 61	36,10%	GGGTTGGAGCCCTGCACGGC[A/G]TCCTCT ATGTGCTGGAGTGC (SEQ ID NO: 6)
rs362306	3' UTR, экзон 67	35,80%	CTGCTGGTTGTTGCCAGGTT[A/G]CAGCTG CTCTTGCATCTGGG (SEQ ID NO: 7)
rs362268	3' UTR, экзон 67	35,80%	TCCTCCCTCCTGCAGGCTGG[C/G]TGTTGG CCCCTSTGCTGTCC (SEQ ID NO: 8)
rs362267	3' UTR, экзон 67	35,50%	GATTTGGGAGCTCTGCTTGC[C/T]GACTGG CTGTGAGACGAGGC (SEQ ID NO: 9)
rs363099	ORF, экзон 29	35,80%	GAAAAGTTTGGAGGGTTTCT[C/T]CGCTCA

			GCCTTGGATGTTCT (SEQ ID NO: 10)
--	--	--	--------------------------------

В одном варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать один или несколько сайтов SNP, перечисленных в **таблице 4**. В одном варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs363125 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362273 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362307 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362336 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362331 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362272 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362306 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362268 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать сайт SNP rs362267 мРНК хантингтина. В другом варианте осуществления, агенты сайленсинга РНК по описанию способны таргетировать SNP-сайт rs363099 мРНК хантингтина. В некоторых вариантах осуществления, сайты SNP, которые таргетируют агенты сайленсинга РНК, ассоциированы с болезнью Хантингтона. В конкретных типовых вариантах осуществления, сайты SNP, которые таргетируют агенты сайленсинга РНК, в значительной степени связаны с болезнью Хантингтона.

В дополнительных типовых вариантах осуществления, агенты сайленсинга РНК включают одну или несколько последовательностей из **Таблиц 5-7**:

Таблица 5

				последовательность	
HTT SNP	наименование соединения	положение snr	дополнительное положение нарушения комплементарности	антисмысловая цепь	смысловая цепь
rs362273	SNP2-7	2	7	UUAGCAUCAGCUUCU CGUGG	AGAAGCUGCUGC UAA
rs362273	SNP4-7	4	7	UUGUAGUAGCAGCUU CUCGU	AAGCUGCUGCUA CAA
rs362273	SNP4-8	4	8	UUGUAGCUGCAGCUU	AAGCUGCUGCUA

				CUCGU	CAA
rs362273	SNP4-15	4	15	UUGUAGCAGCAGCUA CUCGU	AAGCUGCUGCUA CAA
rs362273	SNP6-5A	6	5	UUCUAUAGCAGCAGC UUCUC	GCUGCUGCUACA GAA
rs362273	SNP6-8	6	8	UUCUGUAUCAGCAGC UUCUC	GCUGCUGCUACA GAA
rs362273	SNP6-11	6	11	UUCUGUAGCAUCAGC UUCUC	GCUGCUGCUACA GAA
rs362273	SNP6-14	6	14	UUCUGUAGCAGCAUC UUCUC	GCUGCUGCUACA GAA
rs362273	SNP6-16	6	16	UUCUGUAGCAGCAGC AUCUC	GCUGCUGCUACA GAA
rs362307	SNP3-5G	3	5	UCGCGGACUUCCTAA GGCUC	UUUGGAAGUCCG CGA
rs362307	SNP3-7G	3	7	UCGCAGGCUUCCTAA GGCUC	UUUGGAAGCCUG CGA
rs362307	SNP3-8	3	8	UCGCAGAUUUCCTAA GGCUC	UUUGGAAAUCUG CGA
				U может быть заменен T	

Таблица 6

представляю щий интерес SNP		описание миРНК последовательности, фланкирующей сайт snr		последовательность	
SNP	наименов ание соединен ия	положе ние snr	дополнительн ое положение нарушения комплементар ности	антисмысловая цепь	смысловая цепь
rs362273 (A)	SNP2-7	2	7	UUAGCAUCAGCUU CUCGUGG	AGAAGCUGCUGC UAA
rs362273 (A)	SNP4-7	4	7	UUGUAGUAGCAGC UUCUCGU	AAGCUGCUGCUA CAA

rs362273 (A)	SNP4-8	4	8	UUGUAGCUGCAGC UUCUCGU	AAGCUGCUGC CAA
rs362273 (A)	SNP4-15	4	15	UUGUAGCAGCAGC UACUCGU	AAGCUGCUGC CAA
rs362273 (A)	SNP6-5A	6	5	UUCUAUAGCAGCA GCUUCUC	GCUGCUGC GAA
rs362273 (A)	SNP6-8	6	8	UUCUGUAUCAGCA GCUUCUC	GCUGCUGC GAA
rs362273 (A)	SNP6-11	6	11	UUCUGUAGCAUCA GCUUCUC	GCUGCUGC GAA
rs362273 (A)	SNP6-14	6	14	UUCUGUAGCAGCA UCUUCUC	GCUGCUGC GAA
rs362273 (A)	SNP6-16	6	16	UUCUGUAGCAGCA GCAUCUC	GCUGCUGC GAA
rs362307 (C')	SNP3-5G	3	5	UCGCGGACUCCA AAGGCUC	UUUGGAAGUCCG CGA
rs362307 (C')	SNP3-7G	3	7	UCGCAGGCUCCA AAGGCUC	UUUGGAAGCCUG CGA
rs362307 (C')	SNP3-8	3	8	UCGCAGAUUCCA AAGGCUC	UUUGGAAAUCUG CGA

Таблица 7

представляю щий интерес SNP		описание миРНК последовательности, фланкирующей сайт snp		последовательность	
SNP	наименова ние соединени я	положе ние snp	дополнительное положение нарушения комплементар ности	SNP	наименова ние соединения
rs362273 (G)	SNP2-7	2	7	UCAGCAUCAGC UUCUCGUGG	AGAAGCUGCUGC UGA
rs362273 (G)	SNP4-7	4	7	UUGCAGUAGCA GCUUCUCGU	AAGCUGCUGCUG CAA
rs362273 (G)	SNP4-8	4	8	UUGCAGCUGCA	AAGCUGCUGCUG

				GCUUCUCGU	CAA
rs362273 (G)	SNP4-15	4	15	UUGCAGCAGCA GCUACUCGU	AAGCUGCUGCUG CAA
rs362273 (G)	SNP6-5A	6	5	UUCUACAGCAG CAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCA GAA
rs362273 (G)	SNP6-8	6	8	UUCUGCAUCAG CAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCA GAA
rs362273 (G)	SNP6-11	6	11	UUCUGCAGCAU CAGCUUCUC	GCUGCUGCUGCA GAA
rs362273 (G)	SNP6-14	6	14	UUCUGCAGCAG CAUCUUCUC	GCUGCUGCUGCA GAA
rs362307 (T)	SNP3-5G	3	5	UCACGGACUUC AAAGGCUC	UUUGGAAGUCC GUGA
rs362307 (T)	SNP3-7G	3	7	UCACAGGCUUC AAAGGCUC	UUUGGAAGCCU GUGA
rs362307 (T)	SNP3-8	3	8	UCACAGAUUUC CAAAGGCUC	UUUGGAAAUCU GUGA

В некоторых вариантах осуществления, в таблицах 5-7 нуклеотид U может быть заменен нуклеотидом T.

Способы доставки нуклеиновых кислот

Агенты сайленсинга РНК по описанию могут быть непосредственно введены в клетку (например, нервную клетку) (т.е. внутриклеточно); или введены внеклеточно в полость, интерстициальное пространство, в кровоток организма, введены перорально, или могут быть введены путем промывания клетки или организма в растворе, содержащем нуклеиновую кислоту. Сосудистая или внесосудистая циркуляция, кровь или лимфатическая система и спинномозговая жидкость являются местами, куда может быть введена нуклеиновая кислота.

Агенты сайленсинга РНК по настоящему изобретению могут быть введены с использованием способов доставки нуклеиновой кислоты, известных в данной области техники, включая инъекцию раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, бомбардировку частицами, покрытыми нуклеиновой кислотой, замачивание клетки или организма в растворе нуклеиновой кислоты, или электропорацию клеточных мембран в присутствии нуклеиновой кислоты. Могут быть использованы другие способы, известные в данной области техники для введения нуклеиновых кислот в клетки, такие как липид-опосредованный транспорт носителя, химически-опосредованный транспорт и трансфекция катионными липосомами, такими как фосфат кальция, и подобные. Нуклеиновую кислоту можно вводить вместе с другими компонентами, которые

выполняют одно или несколько из следующих действий: усиливают поглощение нуклеиновой кислоты клеткой или иным образом усиливают ингибирование гена-мишени.

Физические способы введения нуклеиновых кислот включают инъекцию раствора, содержащего РНК, бомбардировку частицами, покрытыми РНК, замачивание клетки или организма в растворе РНК или электропорацию клеточных мембран в присутствии РНК. Вирусная конструкция, упакованная в вирусную частицу, могла бы обеспечить как эффективное введение конструкции экспрессии в клетку, так и транскрипцию РНК, кодируемой конструкцией экспрессии. Можно использовать другие способы, известные в данной области техники для введения нуклеиновых кислот в клетки, такие как липид-опосредованный транспорт носителя, химически-IS опосредованный транспорт, такой как фосфат кальция, и подобные. Таким образом, РНК можно вводить вместе с компонентами, которые выполняют одно или несколько из следующих действий: усиливают поглощение РНК клеткой, ингибируют отжиг одиночных цепей, стабилизируют одиночные цепи или иным образом усиливают ингибирование гена-мишени.

РНК может быть введена непосредственно в клетку (т.е. внутриклеточно) или введена внеклеточно в полость, интерстициальное пространство, в кровоток организма, введена перорально или может быть введена путем промывания клетки или организма в растворе, содержащем РНК. Сосудистая или внесосудистая циркуляция, кровь или лимфатическая система и спинномозговая жидкость являются местами, куда может быть введена РНК.

Клетка, имеющая ген-мишень, может быть из зародышевой линии или соматической, тотипотентной или плюрипотентной, делящейся или не делящейся, паренхимной или эпителиальной, иммортализованной или трансформированной и подобное. Клетка может быть стволовой клеткой или дифференцированной клеткой. К дифференцированным типам клеток относятся адипоциты, фибробласты, миоциты, кардиомиоциты, эндотелий, нейроны, глия, клетки крови, мегакариоциты, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки, лейкоциты, гранулоциты, кератиноциты, хондроциты, остеобласты, остеокласты, гепатоциты и клетки эндокринных или экзокринных желез.

В зависимости от конкретного гена-мишени и дозы доставленного материала двухцепочечной РНК, этот процесс может привести к частичной или полной потере функции гена-мишени. Типовым примером является снижение или потеря экспрессии гена, по меньшей мере, в 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% или более клеток-мишеней. Ингибирование экспрессии гена относится к отсутствию (или наблюдаемому снижению) уровня белка и/или продукта мРНК из гена-мишени. Специфичность относится к способности ингибировать ген-мишень без выраженного воздействия на другие гены клетки. Последствия ингибирования могут быть подтверждены исследованием внешних свойств клетки или организма (как представлено ниже в примерах) или биохимическими методами, такими как гибридизация в растворе РНК, защита от нуклеаз, нозерн-гибридизация, обратная транскрипция, мониторинг экспрессии

генов с микроматрицей, связывание антител, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), другие иммуноанализы, анализ флуоресцентно активированных клеток (FACS) и подобные.

Для РНК-опосредованного ингибирования в клеточной линии или целом организме экспрессию гена удобно анализировать с использованием репортерного гена или гена лекарственной резистентности, белковый продукт которых легко анализируется. Такие репортерные гены включают ацетогидроксикислотную синтазу (AHAS), щелочную фосфатазу (AP), бета-галактозидазу (LacZ), бета-глюкоронидазу (GUS), хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT), зеленый флуоресцентный белок (GFP), пероксидазу хрена (HRP), люциферазу (Luc), нопалинсинтазу (NOS), октопинсинтазу (OCS) и их производные. Доступны несколько селективных маркеров, которые придают резистентность к ампициллину, блеомицину, хлорамфениколу, гентамицину, гигромицину, канамицину, линкомицину, метотрексату, фосфинотрицину, пуромицину и тетрациклину. В зависимости от способа, количественное определение степени экспрессии генов позволяет определить степень ингибирования, превышающую 10%, 33%, 50%, 90%, 95% или 99% по сравнению с клеткой, не обработанной по настоящему описанию. Меньшие дозы вводимого материала и более длительное время после введения агента РНКи могут привести к ингибированию в меньшей части клеток (например, по меньшей мере, 10%, 20%, 50%, 75%, 90% или 95% клеток-мишеней). Количественное определение экспрессии гена в клетке может показать аналогичную степень ингибирования на уровне накопления мРНК-мишени или трансляции белка-мишени. Например, эффективность ингибирования может быть определена путем оценки количества генного продукта в клетке. мРНК можно обнаружить с помощью гибридизационного зонда, имеющего нуклеотидную последовательность за пределами области, используемой для ингибирующей двухцепочечной РНК, или транслируемый полипептид можно обнаружить с помощью антитела, индуцированного против полипептидной последовательности этой области.

РНК может быть введена в количестве, которое обеспечивает доставку, по меньшей мере, одной копии на клетку. Более высокие дозы (например, по меньшей мере, 5, 10, 100, 500 или 1000 копий на клетку) продукта могут давать более эффективное ингибирование; более низкие дозы также могут быть полезны для конкретных применений.

В конкретном аспекте, эффективность агента РНКи по настоящему изобретению (например, миРНК, таргетирующей полиморфизм в мутантном гене) тестируют на его способность специфически расщеплять мутантную мРНК (например, мутантную *htt* мРНК и/или продуцирование мутантного белка хантингтина) в клетках, в частности, в нейронах (например, стриарных или кортикальных нейрональных клональных линиях и/или первичных нейронах). Также подходящими для клеточных анализов проверки являются другие легко трансфицируемые клетки, например, клетки HeLa или клетки COS. Клетки трансфицируют кДНК человека дикого типа или мутантной кДНК (например, кДНК

человека дикого типа или мутантного хантингтина). Котрансфицируют стандартную миРНК, модифицированную миРНК или векторы, способные продуцировать миРНК из мРНК с U-петлей. Измеряют селективное снижение мутантной мРНК (например, мутантной мРНК хантингтина) и/или мутантного белка (например, мутантного хантингтина). Снижение мутантной мРНК или белка можно сравнить с уровнями нормальной мРНК или белка. Экзогенно введенная нормальная мРНК или белок (или эндогенная нормальная мРНК или белок) может быть проанализирована для целей сравнения. При использовании нейронных клеток, которые, как известно, в некоторой степени устойчивы к стандартным методам трансфекции, может быть желательным введение агентов РНКи (например, миРНК) путем пассивного поглощения.

В некоторых типовых вариантах осуществления, композиция, которая включает РНК-агент, например, дсРНК-агент по описанию, может быть доставлена в нервную систему субъекта различными путями. Типовые пути включают интратекальную, паренхиматозную (например, в мозг), назальную и глазную доставку. Композицию также можно вводить системно, например, внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекцией, что особенно полезно для доставки РНК агентов, например, дсРНК агентов, в периферические нейроны. Типовым путем доставки является доставка непосредственно в головной мозг, например, в желудочки или гипоталамус головного мозга, или в латеральные или дорсальные области головного мозга. Агенты РНК, например агенты дсРНК, для доставки в нервные клетки могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения.

Например, композиции могут включать один или несколько видов РНК агента, например дсРНК агент, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от обрабатываемой области. Введение может быть местным (включая офтальмологическое, интраназальное, трансдермальное), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную капельную, подкожную, внутривентрикулярную или внутримышечную инъекцию, интратекальное или внутрижелудочковое (например, интрацеребровентрикулярное) введение. В некоторых типовых вариантах осуществления, агент сайленсинга РНК, по настоящему изобретению доставляется через гематоэнцефалический барьер (BBB) с помощью различных подходящих композиций и способов, описанных в настоящем документе.

Путь доставки может зависеть от нарушения пациента. Например, субъекту, у которого диагностирована болезнь Хантингтона, может быть введен анти-htt РНК агент, например, dsRNA агент, описанный в настоящем описании, непосредственно в головной мозг (например, в бледный шар или полосатое тело базальных ганглиев и примерно средние шипиковые нейроны полосатого тела). В дополнение к агенту сайленсинга по описанию, пациенту может быть назначена вторая терапия, например, паллиативная терапия и/или терапия конкретного заболевания. Вторичная терапия может быть,

например, симптоматической (например, для облегчения симптомов), нейропротекторной (например, для замедления или остановки прогрессирования заболевания) или восстановительной (например, для обращения вспять болезненного процесса). Например, для лечения болезни Хантингтона симптоматическая терапия может включать галоперидол, карбамазепин или вальпроат. Другие методы лечения могут включать психотерапию, физиотерапию, логопедию, помощь в общении и запоминании, услуги социальной поддержки и рекомендации по питанию.

Агент РНК, например агент дсРНК, может быть доставлен в нервные клетки головного мозга. Можно использовать способы доставки, которые не требуют прохождения композиции через гематоэнцефалический барьер. Например, фармацевтическая композиция, содержащая РНК агент, например, дсРНК агент, может быть доставлена пациенту путем инъекции непосредственно в область, содержащую пораженные болезнью клетки. Например, фармацевтическая композиция может быть доставлена путем инъекции непосредственно в головной мозг. Инъекция может быть осуществлена стереотаксической инъекцией в определенную область головного мозга (например, в черную субстанцию, кору, гиппокамп, полосатое тело или бледный шар). РНК агент, например, дсРНК агент, может быть доставлен в несколько областей центральной нервной системы (например, во многие области головного мозга и/или в спинной мозг). РНК агент, например, дсРНК агент, может быть доставлен в диффузные области головного мозга (например, диффузная доставка в кору головного мозга).

В одном варианте осуществления, РНК агент, например, дсРНК агент, может быть доставлен с помощью канюли или другого устройства доставки, один конец которого имплантирован в ткань, например, в головной мозг, например, в черную субстанцию, кору, гиппокамп, полосатое тело или бледный шар головного мозга. Канюля может быть соединена с резервуаром с РНК агентом, например с дсРНК агентом. Поток или доставку можно опосредовать помпой, например, осмотической помпой или минипомпой, такой как помпа Alzet (Duret, Cupertino, CA). В одном варианте осуществления, помпа и резервуар имплантируются в область, удаленную от ткани, например, в брюшную полость, и на доставку влияет канал, ведущий от помпы или резервуара к месту высвобождения. Устройства для доставки в головной мозг описаны, например, в патентах США №№ 6,093,180 и 5,814,014.

РНК агент, например, дсРНК агент по описанию, может быть дополнительно модифицирован таким образом, чтобы он был способен преодолевать гематоэнцефалический барьер. Например, РНК агент, например, дсРНК агент, может быть конъюгирован с молекулой, которая позволяет агенту преодолевать барьер. Такие модифицированные РНК агенты, например, дсРНК агенты, можно вводить любым желательным способом, таким как внутривенная или внутримышечная инъекция, или, например, легочной доставкой.

В некоторых вариантах осуществления, экзосомы используют для доставки РНК агента, например, дсРНК агента по описанию. Экзосомы могут пересекать BBB и

доставлять миРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, химиотерапевтические агенты и белки специфически к нейронам после системной инъекции (см. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011 Apr;29(4):341-5. doi: 10.1038/nbt.1807; El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, Li J, Seow Y, Gardiner C, Alvarez-Erviti L, Sargent IL, Wood MJ.(2011). Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 2012 Dec;7(12):2112-26. doi: 10.1038/nprot.2012.131; EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 May;12(5):347-57. doi: 10.1038/nrd3978; El Andaloussi S, Lakhali S, Mäger I, Wood MJ. (2013). Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv. Drug Deliv Rev.* 2013 Mar;65(3):391-7. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.008).

В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько липофильных молекул используют для обеспечения доставки РНК агента, например, dsRNA агента по описанию через BBB (Alvarez-Ervit (2011)). Агент сайленсинга РНК затем активируется, например, ферментативной деградацией липофильной маскировки, чтобы высвободить лекарство в его активную форму.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько опосредованных рецептором пермеабилизирующих соединений можно использовать для увеличения проницаемости BBB, чтобы сделать возможной доставку агента сайленсинга РНК по описанию. Эти лекарственные средства временно повышают проницаемость BBB за счет повышения осмотического давления в крови, что ослабляет плотные контакты между эндотелиальными клетками ((El-Andaloussi (2012))). Ослабляя плотные соединения, можно выполнить обычную внутривенную инъекцию агента сайленсинга РНК.

В некоторых вариантах осуществления, системы доставки на основе наночастиц используют для доставки РНК агента, например dsРНК агента, по описанию, через BBB. Используемый в настоящем документе термин «наночастицы» относится к полимерным наночастицам, которые обычно представляют собой твердые биоразлагаемые коллоидные системы, которые широко исследовались в качестве носителей лекарственных средств или генов (. P. Egusquiaguirre, M. Igartua, R. M. Hernandez, and J. L. Pedraz, «Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research», *Clinical and Translational Oncology*, vol. 14, no. 2, pp. 83-93, 201). Полимерные наночастицы подразделяются на две основные категории: природные полимеры и синтетические полимеры. Природные полимеры для доставки миРНК включают, но не ограничены ими, циклодекстрин, хитозан и ателоколлаген (Y. Wang, Z. Li, Y. Han, L. H. Liang, and A. Ji, «Nanoparticle-based delivery system for application of siRNA in vivo», *Current Drug Metabolism*, vol. 11, no. 2, pp. 182-196, 2010). Синтетические полимеры включают, помимо прочего, полиэтиленмин (PEI), поли(dl-лактид-со-гликолид) (PLGA) и дендримеры, которые интенсивно исследовались (X. Yuan, S. Naguib, and Z. Wu, «Recent advances of siRNA delivery by nanoparticles», *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, no. 4, pp. 521-536, 2011). Обзор наночастиц и других подходящих систем доставки см. в Jong-Min Lee, Tae-

Jong Yoon, and Young-Seok Cho, «Recent Developments in Nanoparticle-Based siRNA Delivery for Cancer Therapy», BioMed Research International, vol. 2013, Article ID 782041, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/782041 (полностью включена посредством ссылки).

РНК агент, например, дсРНК агент по описанию, можно вводить окулярно, например, для лечения заболевания сетчатки, например, ретинопатии. Например, фармацевтические композиции можно наносить на поверхность глаза или близлежащие ткани, например, внутреннюю часть века. Их можно наносить местно, например, путем распыления, в виде капель, в виде примочек для глаз или в виде мази. Мази или жидкости для капель могут быть доставлены с помощью систем доставки в глаза, известных в данной области техники, таких как аппликаторы или глазные капельницы. Такие композиции могут включать мукомиметики, такие как гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, гидроксипропилметилцеллюлоза или поли(виниловый спирт), консерванты, такие как сорбиновая кислота, EDTA или хлорид бензилхрония, и обычные количества разбавителей и/или носителей. Фармацевтическую композицию также можно вводить внутрь глаза и можно вводить с помощью иглы или другого устройства для доставки, которое может вводить ее в выбранную область или структуру. Композицию, содержащую агент сайленсинга РНК, можно также наносить с помощью глазного пластыря.

Как правило, РНК агент, например, дсРНК агент по описанию, можно вводить любым подходящим способом. В данном контексте, местная доставка может относиться к прямому нанесению РНК агента, например, дсРНК агента, на любую поверхность тела, включая глаза, слизистую оболочку, поверхности полости тела или любую внутреннюю поверхность. Препараты для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, спреи и жидкости. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и подобные. Местное введение также можно использовать в качестве средства для селективной доставки РНК агента, например, dsRNA агента, в эпидермис или дерму субъекта, или в ее определенные слои, или в подлежащую ткань.

Композиции для интратекального или интравентрикулярного (например, интрацеребровентрикулярного) введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Композиции для интратекального или внутрижелудочкового введения обычно не включают реагент для трансфекции или дополнительную липофильную группу, кроме, например, липофильной группы, присоединенной к РНК агенту, например дсРНК агенту.

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Внутрижелудочковая инъекция может быть облегчена с помощью внутрижелудочкового катетера, например, прикрепленного к резервуару. При внутривенном введении необходимо контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы сделать препарат изотоническим.

РНК агент, например, дсРНК агент по описанию, можно вводить субъекту путем доставки в легкие. Композиции для доставки в легкие можно доставлять путем вдыхания дисперсии, так что композиция в составе дисперсии может достигать легких, где она может легко всасываться через альвеолярную область непосредственно в кровоток. Легочная доставка может быть эффективной как при системной доставке, так и при локальной доставке для лечения заболеваний легких. В одном варианте осуществления, РНК агент, например, дсРНК агент, вводимый легочной доставкой, был модифицирован таким образом, что он способен преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Легочная доставка может быть достигнута с помощью различных подходов, включая использование небулайзерных, аэрозольных, мицеллюлярных и сухих порошкообразных составов. Доставка может быть достигнута с помощью небулайзеров для жидкости, аэрозольных ингаляторов и устройств для диспергирования сухого порошка. Устройства с отмеренными дозами являются типовыми. Одно из преимуществ использования распылителя или ингалятора заключается в том, что вероятность заражения сводится к минимуму, поскольку устройства являются автономными. Устройства для диспергирования сухих порошков, например, доставляют лекарственные средства, которые можно легко приготовить в виде сухих порошков. Композиция агента сайленсинга РНК, может стабильно храниться в виде лиофилизированных или высушенных распылением порошков сама по себе или в сочетании с подходящими порошкообразными носителями. Доставка композиции для ингаляции может быть опосредована дозирующим элементом времени, который может включать в себя таймер, счетчик дозы, устройство измерения времени или индикатор времени, который при включении в устройство позволяет отслеживать дозу, контролировать соблюдение и/или срабатывание дозы у пациента во время введения аэрозольного лекарственного средства.

Типы фармацевтических эксципиентов, которые можно использовать в качестве носителей, включают стабилизаторы, такие как сывороточный альбумин человека (HSA), наполнители, такие как углеводы, аминокислоты и полипептиды; регуляторы pH или буферы; соли, такие как хлорид натрия; и подобные. Эти носители могут быть в кристаллической или аморфной форме или могут представлять собой их смесь.

Наполнители, которые являются особенно ценными, включают совместимые углеводы, полипептиды, аминокислоты или их комбинации. Подходящие углеводы включают моносахариды, такие как галактоза, D-манноза, сорбоза и подобные; дисахариды, такие как лактоза, трегалоза и подобные; циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин; и полисахариды, такие как раффиноза, мальтодекстрины, декстраны и подобные; альдиты, такие как маннит, ксилит и подобные. Типовая группа углеводов включает лактозу, трегалозу, мальтодекстрины раффинозы и маннит. Подходящие полипептиды включают аспартам. Аминокислоты включают аланин и глицин, примером которых является глицин.

Подходящие регуляторы pH или буферы включают органические соли, полученные из органических кислот и оснований, такие как цитрат натрия, аскорбат натрия и

подобные; цитрат натрия является типовым.

РНК агент, например, дсРНК агент по описанию, можно вводить перорально и назально. Например, лекарственные средства, вводимые через эти мембраны, имеют быстрое начало действия, обеспечивают терапевтические уровни в плазме, избегают эффекта первого прохождения метаболизма в печени и избегают воздействия лекарственного средства на неблагоприятную среду желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Дополнительные преимущества включают легкий доступ к участкам мембраны, что позволяет легко наносить, локализовать и удалять лекарственное средство. В одном варианте осуществления, средство, подавляющее РНК, вводимое перорально или назально, было модифицировано, чтобы оно могло проникать через гематоэнцефалический барьер.

В одном варианте осуществления, стандартные дозы или отмеренные дозы композиции, включающей РНК агенты, например, дсРНК агенты, вводят с помощью имплантированного устройства. Устройство может включать в себя датчик, который отслеживает параметр внутри субъекта. Например, устройство может включать помпу, такую как осмотическая помпа, и, необязательно, соответствующую электронику.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в настоящем документе способов могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки описанных в настоящем документе вариантов осуществления. Теперь, после подробного описания некоторых вариантов осуществления, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Дискриминация SNP варьируется в зависимости от положения нарушения комплементарности

На **ФИГ. 46** представлена блок-схема, иллюстрирующая методологию создания и выбора SNP-дискриминирующих миРНК, которая была реализована в случае НТТ, но также применима к SNP в других генах. Первичный скрининг проводится для определения того, какое положение SNP вызывает наибольшую дискриминацию. Затем выбираются положения нарушения комплементарности, дающие наилучшие результаты, и аффинность к аллелям вне мишени дополнительно снижается при вторичном скрининге, когда выбираются химические и структурные оптимизации молекулы миРНК с улучшенной селективностью и/или эффективностью.

Есть несколько SNP в гене НТТ, которые имеют высокие показатели гетерозиготности у пациентов с HD (**ФИГ. 45**). Для оптимизации SNP-специфического РНКи-опосредованного сайленсинга хантингтина SNP rs362273 в экзоне 57 мРНК НТТ использовали в качестве модели-мишени для оптимизации селективного сайленсинга SNP. Эта гетерозиготность SNP встречается у 35% пациентов с HD.

Описанная в настоящем документе репортерная плаزمида psiCHECK содержит

SNP rs362273 и частичную фланкирующую область от экзона 57 htt в 3' UTR Rluc. Репортерная плаزمида psiCHECK дикого типа содержит ту же область htt без SNP (**ФИГ. 1**).

Гидрофобно-модифицированные РНК (hsiРНК), сконструированные таким образом, чтобы они были комплементарны мРНК хантингтина (htt), содержащей мутантный SNP (2273-1 (A)), подвергали скринингу на эффективность с помощью репортерной плазмидной системы psiCheck. Число, следующее за SNP, представляет положение SNP в мРНК (**ФИГ. 47**). На **ФИГ. 2** показано, что размещение SNP в положении 2, 4 или 6 обеспечивало наибольшую дискриминацию SNP без потери эффективности против мутантного аллеля. Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, подвергали обратной трансфекции 1,5 мкМ hsiРНК путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Активность люциферазы измеряли через 72 часа после трансфекции (**ФИГ. 2**).

hsiРНК дополнительно тестировали на распознавание аллелей в анализе доза-ответ с двойной люциферазой в клетках HeLa (**ФИГ. 3**). Множественные hsiРНК предпочтительно подавляли репортерную плазмиду, содержащую мутантный SNP, по сравнению с репортерной плазмидой дикого типа. Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, подвергали обратной трансфекции 1,5 мкМ hsiРНК путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Экспрессию репортерной плазмиды измеряли через 72 часа после трансфекции (**ФИГ. 3**).

Пример 2: Дискриминация SNP в эндогенной мРНК Htt

hsiРНКs тестировали на эффективность против эндогенной мРНК хантингтина, содержащей гомозиготный SNP rs362273. Поскольку клетки HeLa являются гомозиготными по rs362273, с А на каждом аллеле, аллельную дискриминацию не оценивали с помощью этого анализа. Вместо этого на **ФИГ. 4** показано, что две hsiРНК, SNP4-0 и SNP6-0, были высокоэффективны в подавлении мРНК htt, содержащей правильное SNP. Уровни мРНК измеряли с использованием анализа рДНК Quantigene 2.0 после обработки клеток HeLa hsiРНК путем пассивного поглощения в течение 72 часов. Уровни мРНК htt человека нормализовали по HPRT человека.

Пример 3: Конструирование hsiРНК со вторым нарушением комплементарности для большей аллельной дискриминации

Для каждой из трех hsiРНК (SNP2-0, SNP4-0 и SNP6-0, также называемых mm2, mm4 и mm6, соответственно), ранее выбранных для определения ответа на дозу, было сконструировано и синтезировано 16 новых hsiРНК с незначительными модификациями последовательности (**ФИГ. 34**). Эти последовательности вводили одно нарушение комплементарности в каждом возможном положении исходной последовательности, чтобы проверить, не ухудшает ли второе нарушение комплементарности подавление SNP вне мишени более значительно, чем раньше, с небольшим влиянием на подавление SNP-мишени. Последовательности антисмысловых цепей показаны с 5' по 3', где сайт SNP показан красным, и новое нарушение комплементарности показано синим (**ФИГ. 12**).

Первичный скрининг эффективности hsiPHK на **ФИГ. 12** показывает, что положение второго нарушения комплементарности относительно положения нуклеотида, соответствующего SNP, приводит к различным уровням дискриминации SNP в клетках HeLa. Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид psiCHECK, обратно трансфицировали 1,5 мкМ hsiPHK путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Активность люциферазы измеряли через 72 часа после трансфекции. На **ФИГ. 5** показано, что несколько hsiPHK избирательно подавляют репортерную плазмиду, содержащую мутацию SNP, по сравнению с репортерной плазмидой дикого типа.

Наиболее эффективные hsiPHK, содержащие второе нарушение комплементарности, дополнительно тестировали на кривой доза-ответ для подтверждения улучшенного распознавания SNP. Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, обратно трансфицировали hsiPHK путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Экспрессию репортера измеряли с помощью анализа двойной люциферазы. На **ФИГ. 6-8** показаны значения IC₅₀ hsiPHK с двумя нарушениями комплементарности для сайленсинга репортерной плазмиды, содержащей мутацию SNP, по сравнению с репортерной плазмидой дикого типа. HsiPHK SNP6-11 (молекула hsiPHK с нуклеотидом, соответствующим полиморфизму в положении 6 от 5' конца и нарушением комплементарности в положении 11 от 5' конца) и hsiPHK SNP4-7 (молекула hsiPHK с нуклеотидом, соответствующим полиморфизму в положении 4 от 5' конца и нарушением комплементарности в положении 7 от 5' конца) оказались наиболее эффективными (см. **ФИГ. 7-9**). Удивительно, но изменение паттерна модификации вокруг SNP спасает утраченную эффективность за счет введения второго нарушения комплементарности без ухудшения дискриминации. HsiPHK SNP6-11 была изменена таким образом, что она имела 2'-О-метильные модификации, фланкирующие несовпадающий нуклеотид (а также сам несовпадающий нуклеотид, имеющий 2'-О-метильную модификацию) (см. **ФИГ. 10**).

Пример 4: Дополнительные модификации

Различные типы олигонуклеотидов (например, гэтмеры, миксмеры, ингибиторы микроРНК, сплайс-переключающие олигонуклеотиды («SSO»), фосфородиамидатные морфолиноолигонуклеотиды («PMO»), пептидные нуклеиновые кислоты («PNA») и подобные) могут быть использованы в олигонуклеотидах, описанных в настоящем документе, необязательно с использованием различных комбинаций модификаций (например, химических модификаций) и/или конъюгаций, описанных в настоящем документе и, например, в заявке США с серийным № 15/089,423; заявке США с серийным № 15/236,051; заявке США с серийным № 15/419,593; заявке США с серийным № 15/697,120 и патенте США № 9,809,817; и заявке США с серийным № 15/814,350 и патенте США № 9,862,350, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Например, олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, может быть сконструирован как ди-миРНК (см., например, **ФИГ. 14**). Описанный в настоящем

документе олигонуклеотид может включать одну или несколько различных связей скелета (см., например, **ФИГ. 15**). Описанный в настоящем документе олигонуклеотид может включать множество модификаций сахара (см., например, **ФИГ. 16**). Описанный в настоящем документе олигонуклеотид может включать различные межнуклеотидные связи (см., например, **ФИГ. 17**). Описанный в настоящем документе олигонуклеотид может включать одну или несколько модификаций стабилизации 5' конца (см., например, **ФИГ. 18**). Описанный в настоящем документе олигонуклеотид может включать одну или несколько конъюгированных групп (см., например, **ФИГ. 19**). Как показано на **ФИГ. 35** представлен ряд типовых модификаций олигонуклеотидного остова.

Описанный в настоящем документе олигонуклеотид можно эффективно использовать для таргетирования G в сайте SNP, просто заменив основание в положении SNP. Как видно на **ФИГ. 33**, соединение SNP6-11 было синтезировано во второй раз, на этот раз для таргетирования G в сайте SNP вместо A. Это позволило селективно заглушить любой аллель, стратегия, которая очень полезна для пациентов с различной гетерозиготностью на одном и том же сайте SNP.

В некоторых типовых вариантах осуществления, один или несколько нуклеотидов с удаленным азотистым основанием используют в нуклеотиде в положении SNP, в нуклеотиде в положении MM, на 5' конце, на 3' конце или в любой их комбинации.

В некоторых типовых вариантах осуществления, hsiPHK синтезируют с различными модификациями сахара вокруг нарушения комплементарности для улучшения специфичности аллеля, например, 2'FANA вместо 2'F; тройным 2'F или тройной 2'OMe вокруг положения SNP/нарушения комплементарности.

Пример 5: Модель НТТ мыши

BAC97-HD относится к трансгенной мыши, содержащей трансгенную вставку искусственной бактериальной хромосомы человека (BAC), содержащую весь патогенный геномный локус хантингтина (htt) человека длиной 170 т.п.н., который был модифицирован путем замены экзона 1 htt человека последовательностью экзона 1, фланкированного loxP мутантного htt человека, содержащей 97 смешанных повторов CAA-CAG, кодирующих непрерывный участок полиглутамина (polyQ).

Соединение свинца (SNP6-11) синтезировали в виде разветвленного химического каркаса, имеющего структуру, показанную на **ФИГ. 31**, а затем тестировали *in vivo* с помощью двусторонней интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) инъекции 40 нмоль (по 20 нмоль в каждую сторону) самкам мышей BAC97-HD в возрасте 8 недель. Мыши имели две копии нормального гена htt мыши с G в SNP rs362273 и трансгенную вставку патогенного гена htt человека с A в SNP rs362273A. Нонсенс-последовательность, не имеющая целевых совпадений в транскриптоме РНК, также была синтезирована в том же двухразветвленном каркасе и введена мышам в качестве отрицательного контроля (NTC).

У мышей брали несколько областей мозга для анализа РНК и белка через 1 месяц после инъекции, и уровни белка НТТ измеряли вестерн-блоттингом с использованием антитела Ab1. **ФИГ. 32А** представляет вестерн-блоттинг, выполненный на собранной

ткани полосатого тела, и уровни белка, нормализованные по винкулину, представлены на **ФИГ. 32В**.

Пример 6. Таргетинг SNP не зависит от последовательности

Оценивали, зависит ли дискриминация SNP ведущих соединений от последовательности. Использовали гидрофобно-модифицированные РНК (hsiРНК), сконструированные так, чтобы они были комплементарны мРНК хантингтина (htt), содержащей нарушение комплементарности U-G или нарушение комплементарности C-A в rs362273. И hsiРНК 6-11, комплементарная нарушению комплементарности U-G, так и hsiРНК 6-11, комплементарная нарушению комплементарности C-A, преимущественно расщепляли SNP-мишень (**ФИГ. 20**).

Пример 7: Синтез винилфосфонат-модифицированных межсубъединичных связей

Типовые синтезы винилфосфинат-модифицированных межсубъединичных связей, обсуждаемые в настоящем документе, показаны на **ФИГ. 21** и **29**. Методика синтеза на **ФИГ. 21** подробно описана ниже.

Синтез соединения 3a

К безводному раствору соединения **2a** (16,6 г, 20,8 ммоль) в пиридине (100 мл) добавляли безводный ДИПЭА (6,5 мл, 37,4 ммоль) и бензоилхлорид (3,6 мл, 31,2 ммоль). После перемешивания смеси в течение 4 часов при комнатной температуре избыток пиридина выпаривали и разбавляли CH_2Cl_2 . Органический раствор промывали насыщ. водным NaHCO_3 . Органический слой собирали, сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан-этилацетат, 4:1-1:1), получая соединение **3a** в виде слегка желтоватой пены (14,5 г, 78%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,88-7,87 (м, 2H), 7,84 (д, 1H, $J=8,3$ Гц), 7,67-7,58 (м, 5H), 7,48-7,45 (м, 4H), 7,39-7,32 (м, 4H), 7,25-7,23 (м, 3H), 7,18-7,17 (м, 2H), 7,12-7,07 (м, 4H), 6,80-6,75 (м, 4H), 6,08 (дд, 1H), $J_{\text{HH}}=1,5$ Гц, $J_{\text{HF}}=15,2$ Гц), 5,14, (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,3$ Гц), 4,59 (ддд, 1H, $J_{\text{HH}}=3,7$, 1,5 Гц, $J_{\text{HF}}=51,9$ Гц), 4,43 (ддд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,4$, 4,0 Гц, $J_{\text{HF}}=19,1$ Гц), 4,24-4,23 (м, 1H), 3,79 (с, 6H), 3,62 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=11,2$, 2,0 Гц), 3,35 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=11,1$, 2,0 Гц), 1,00 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 168,4, 161,8, 158,72, 158,66, 148,9, 143,9, 139,4, 135,71, 135,70, 135,1, 134,8, 134,7, 132,3, 132,2, 131,3, 130,4, 130,2, 130,1, 129,1, 128,2, 128,0, 127,91, 127,89, 127,2, 113,19, 113,16, 102,2, 92,5 (д, $J_{\text{CF}}=194,4$ Гц), 87,7 (д, $J_{\text{CF}}=34,5$ Гц), 87,2, 82,4, 70,0 (д, $J_{\text{CF}}=15,4$ Гц), 60,7, 60,4, 55,2, 26,6.

Синтез соединения 4a

Соединение **3a** (14,5 г, 16,3 ммоль) растворяли в растворе 3% трихлоруксусной кислоты/ CH_2Cl_2 (200 мл), содержащем триэтилсилан (8,0 мл, 50,1 ммоль), и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки раствора насыщ. водным NaHCO_3 трижды, собранный органический слой сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 4:1-3:7), с получением соединения **4a** в виде белой пены (8,67 г, 91%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,89-7,88 (м, 2H), 7,68-7,64 (6H, м), 7,51-7,45 (м,

4H), 7,42-7,38 (4H, м), 5,93 (дд, 1H, $J_{HH}=2,9$ Гц, $J_{HF}=15,1$ Гц), 5,73 (д, 1H, $J_{HH}=8,2$ Гц), 4,74 (ддд, 1H, $J_{HH}=4,1$, 3,2 Гц, $J_{HF}=52,2$ Гц), 4,31 (ддд, 1H, $J_{HH}=5,8$, 4,7, $J_{HF}=15,4$ Гц), 4,11-4,09 (м, 1H), 3,82-3,79 (м, 1H), 3,39 (ддд, 1H, $J_{HH}=12,1$, 5,6, 1,5 Гц), 1,64 (ш, 1H), 1,11 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 168,3, 161,8, 149,0, 140,5, 135,7, 135,2, 132,8, 132,3, 131,3, 130,5, 130,4, 130,3, 129,2, 128,02, 127,96, 102,4, 91,8 (д, $J_{CF}=91,8$ Гц), 89,5 (д, $J_{CF}=33,6$ Гц), 69,5 (д, $J_{CF}=69,5$ Гц), 60,3, 26,8.

Синтез соединения 6a

К безводному раствору соединения **4a** (6,5 г, 11,0 ммоль) добавляли IBX (7,7 г, 27,6 ммоль) и перемешивали в течение 2 часов при 85°C. После охлаждения смеси на бане со льдом, осадок в растворе отфильтровывали через целит. Собранный элюент выпаривали, трижды совместно выпаривали с безводным CH_3CN в атмосфере аргона и полученное соединение **5a** в виде белой пены использовали без дополнительной очистки. В отдельную колбу к безводному раствору CH_2Cl_2 (25 мл), содержащему CBr_4 (7,3 г, 22,1 ммоль), добавляли PPh_3 (11,6 г, 44,2 ммоль) при 0°C и перемешивали в течение 0,5 ч при 0°C. К этому раствору добавляли по каплям (10 мин) безводный раствор CH_2Cl_2 (25 мл) соединения **5a** при 0°C и перемешивали в течение 2 ч при 0°C. После разбавления CH_2Cl_2 органический раствор промывали водн. насыщ. NH_4Cl , сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Полученный продукт растворяли в минимальном количестве диэтилового эфира и добавляли по каплям к избытку раствора в диэтиловом эфире при интенсивном перемешивании при 0°C. Осадок в растворе отфильтровывали через целит, элюенты выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 9:1-1:1), получая соединение **6a** в виде белой пены (4,3 г, 52%). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,68-7,84 (м, 2H), 7,70-7,65 (м, 3H), 7,60-7,58 (м, 2H), 7,52-7,49 (м, 2H), 7,42-7,36 (м, 4H), 7,31-7,28 (м, 2H), 7,09 (д, 1H, $J=8,2$ Гц), 6,25 (д, 1H, $J=8,9$ Гц), 5,75 (дд, 1H, $J_{HF}=8,24$ Гц), 5,49 (дд, 1H, $J_{HF}=21,4$ Гц), 4,77 (т, 1H, $J_{HH}=8,5$ Гц, $J_{HF}=8,5$ Гц), 4,38 (дд, 1H, $J_{HH}=4,1$ Гц, $J_{HF}=52,1$ Гц), 4,25 (ддд, 1H, $J_{HH}=8,1$, 4,9 Гц, $J_{HF}=19,4$ Гц), 1,10 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 167,9, 161,6, 148,3, 141,4, 135,8, 134,7 (д, $J_{C-Br}=139,0$ Гц), 132,5, 132,2, 131,1, 130,5, 130,3, 130,2, 129,2, 127,9, 102,7, 97,3, 93,3 (д, $J_{CF}=39,1$ Гц), 91,5 (д, $J_{CF}=190,7$ Гц), 82,4, 73,9 (д, $J_{CF}=16,4$ Гц), 26,7.

Синтез соединения 7a-E и 7a-Z

К безводному раствору соединения **6a** (4,2 г, 5,66 ммоль) в ДМФ (25 мл) добавляли диметилфосфит (2,09 мл, 22,6 ммоль) и триэтиламин (1,58 мл, 11,3 ммоль) при 0°C, и затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После разбавления раствора этилацетатом органический раствор промывали водн. насыщ. NH_4Cl и раствором соли. Затем органический раствор сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Полученный неочищенный продукт неоднократно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 9:1-1:1) до тех пор, пока все чистое изомерное соединение не собирали отдельно, получая соединение **7a-E** (1,95 г, 52%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,87-7,85 (м, 2H), 7,89-7,85 (м, 3H), 7,61-7,59 (м, 2H), 7,52-7,48 (м, 2H), 7,45-7,32 (м, 6H), 7,08 (д, 1H, $J_{HH}=8,2$), 6,49 (д, 1H, $J_{HH}=13,7$), 5,99 (дд, 1H, $J_{HH}=13,7$ Гц, 8,1 Гц), 5,75 (д, 1H, $J_{HH}=8,2$),

5,63 (д, 1H, $J_{\text{HF}}=19,8$ Гц), 4,43 (дд, 1H, $J_{\text{HF}}=52,6$ Гц, $J_{\text{HH}}=4,3$ Гц), 4,42 (т, 1H, $J_{\text{HH}}=8,0$ Гц), 4,07 (ддд, $J_{\text{HH}}=7,8$, 4,7 Гц, $J_{\text{HF}}=19,5$ Гц), 1,08 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 148,4, 140,4, 135,8, 135,7, 135,3, 133,3, 132,3, 132,4, 132,1, 131,1, 130,5, 130,4, 130,3, 129,2, 127,95, 127,93, 112,4, 102,7, 91,7 (д, $J_{\text{CF}}=36,3$ Гц), 91,6 (д, $J_{\text{CF}}=191,6$ Гц), 82,8, 73,9 (д, $J_{\text{CF}}=16,4$ Гц), 26,7, 19,1; и **7a-Z** (0,58 г, 15%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,87-7,85 (м, 2H), 7,68-7,65 (м, 3H), 7,61-7,59 (м, 2H), 7,52-7,48 (м, 2H), 7,42-7,39 (м, 2H), 7,34-7,29 (м, 4H), 7,12 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 6,51 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=7,4$ Гц), 5,96 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=8,4$ Гц, 7,4 Гц), 5,75 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 5,57 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=1,2$ Гц, $J_{\text{HF}}=20,6$ Гц), 5,04 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 4,48 ($J_{\text{HH}}=3,5$ Гц, $J_{\text{HF}}=53,1$ Гц), 4,24 (ддд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,8$, 4,9 Гц, $J_{\text{HF}}=18,6$ Гц), 1,09 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 168,0, 161,7, 148,4, 141,4, 135,9, 135,8, 135,2, 132,6, 132,5, 131,2, 130,6, 130,5, 130,2, 130,1, 129,2, 127,8, 127,7, 114,5, 102,6, 93,0 (д, $J_{\text{CF}}=37,2$ Гц), 91,6 (д, $J_{\text{CF}}=191,6$ Гц), 80,3, 74,3 (д, $J_{\text{CF}}=16,4$ Гц), 26,7, 19,1.

Синтез соединения 9a

Безводное соединение **7a-E** (1,95 г, 2,94 ммоль) и $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (125 мг, 0,59 ммоль) и [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (652 мг, 1,18 ммоль) продували аргоном и затем растворяли в безводном ТГФ (50 мл). После добавления пропиленоксида (2,06 мл, 29,4 ммоль) одной порцией добавляли соединение **8a** (2,07 г, 3,24 ммоль) и перемешивали в течение 4 ч при 70°C. После удаления растворителя при пониженном давлении неочищенную смесь очищали колоночной хроматографией с силикагелем (гексан/этилацетат, 50:50-0:100) и полученные фракции, содержащие соединение **9a**, дополнительно очищали колоночной хроматографией с силикагелем (CH_2Cl_2 -MeOH, 0% - 5%), получая соединение **9a** в виде смеси диастереоизомеров (2,04 г, 57%); ^{31}P ЯМР (202 МГц, CDCl_3) δ 18,3.

Синтез соединения 10a

К соединению **9a** (2,0 г, 1,64 ммоль) в безводном ТГФ (22,5 мл) добавляли 1,0 М ФТБА-ТГФ (2,5 мл, 2,5 ммоль) и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 минут. После разбавления CH_2Cl_2 (120 мл) органический слой промывали раствором соли, сушили над MgSO_4 , фильтровали и затем выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1% ТЭА- CH_2Cl_2 /MeOH, 0-6%), получая соединение **10a** (1,52 г, 94%); ^{31}P ЯМР (202 МГц, CDCl_3) δ 19,0, 18,7.

Синтез соединения 11a

Соединение **10a** (589,7 мг, 0,6 ммоль) обезвоживали повторным совместным выпариванием с безводным CH_3CN и затем растворяли в безводном CH_2Cl_2 (6,0 мл). К этому раствору добавляли N, N-диизопропилэтиламин (0,31 мл, 1,8 ммоль) и 2-цианоэтил-N, N-диизопропилхлорфосфорамидит (0,16 мл, 0,72 ммоль) при 0°C. После перемешивания в течение 30 мин при 0°C, реакционную смесь разбавляли избытком CH_2Cl_2 . Органический слой неоднократно промывали водн. насыщ. NaHCO_3 , сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1% ТЭА- CH_2Cl_2 /MeOH, от 100% до 4%), с

получением соединения **11a** в виде белой пены (570 мг, 80%); ^{31}P ЯМР (202 МГц, CDCl_3) δ 150,3, 151,2, 151,1, 151,0, 18,72, 18,65, 18,55, 18,3.

Синтез соединения 4b

К безводному раствору соединения **3b** (1,35 г, 2,0 ммоль) в пиридине (10 мл) добавляли ДИПЭА (0,63 мл, 3,6 ммоль) и бензоилхлорид (0,35 мл, 3,0 ммоль) и перемешивали в течение 3 часов при комнатной температуре. После разбавления избытком CH_2Cl_2 , органический раствор промывали водн. насыщ. NaHCO_3 и раствором соли. После сушки над MgSO_4 , фильтрации и выпаривания, полученный неочищенный продукт использовали для следующей реакции без дополнительной очистки. К полученному неочищенному материалу, содержащему соединение **3b**, добавляли 3% трихлоруксусную кислоту в CH_2Cl_2 (25 мл) и триэтилсилан (1 мл, 6,26 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. После разбавления реакционной смеси CH_2Cl_2 , раствор три раза промывали насыщ. водн. NaHCO_3 , сушили над MgSO_4 , фильтровали, затем выпаривали. Полученный неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 4:1-1:4), с получением чистого соединения **4b** (596,7 мг, 63% в 2 стадии); ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 8,13 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 7,95 (д, 2H, $J_{\text{HH}}=7,3$ Гц), 7,81 (т, 1H, $J_{\text{HH}}=7,5$ Гц), 7,69-7,68 (м, 2H), 7,64-7,59 (м, 4H), 7,49-7,42 (м, 6H), 5,93 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=4,6$ Гц), 5,26 (т, 1H, $J_{\text{HH}}=4,6$ Гц), 4,36 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=4,6$, 4,6 Гц), 4,02-4,00 (м, 1H), 3,65-3,61 (м, 1H), 3,54 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=4,6$, 4,6 Гц), 3,09 (с, 3H), 1,03 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, DMSO-D_6) 169,8, 162,1, 149,5, 141,3, 136,1, 135,9, 135,8, 133,4, 133,2, 131,5, 130,7, 130,52, 130,48, 130,0, 128,4, 128,3, 102,1, 86,7, 85,6, 82,8, 79,7, 70,8, 60,2, 57,8, 27,2, 19,4; МСВР (ИЭР) m/z рассчитано для $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}^-$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ m/z 599,2219, найдено m/z 599,2258.

Синтез соединения 6b

К безводному раствору соединения **4b** (300,4 мг, 0,5 ммоль) в CH_3CN (5 мл) добавляли IBX (350 мг, 1,3 ммоль) и перемешивали в течение 2 часов при 85°C. После охлаждения раствора при 0°C осадок отфильтровывали через целит. Полученный элюент, содержащий соединение **5b**, выпаривали, обезвоживали путем повторного совместного выпаривания с безводным CH_3CN и использовали для следующей реакции без дополнительной очистки. Отдельно приготовленный безводный раствор CBr_4 (331,6 мг, 1,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (5,0 мл), добавляли трифенилфосфин (524,6 мг, 2,0 ммоль) при 0°C одной порцией и перемешивали при 0°C в течение 30 минут. К этому раствору по каплям добавляли соединение **5b** в безводном CH_2Cl_2 (1,5 мл) (10 мин) при 0°C и перемешивали в течение 2 ч при 0°C. Затем раствор разбавляли CH_2Cl_2 и промывали водн. насыщ. NaHCO_3 и соевым раствором. После того, как органический раствор был высушен над MgSO_4 , отфильтрован и выпарен, полученный неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 9:1-4:6), с получением соединения **6b** (210,9 мг, 56%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,88 (д, 2H, $J_{\text{HH}}=7,3$ Гц), 7,70-7,62 (5H, м), 7,51-7,38 (м, 9H), 7,08 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 6,26 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,6$ Гц), 5,75 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,2$ Гц), 5,68 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=0,8$ Гц), 4,84 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=8,6$ Гц, 8,6 Гц), 3,86 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,5$ Гц, 5,0 Гц),

3,30 (с, 3H), 3,18 (ш, 1H), 1,11 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) 168,3, 161,7, 148,6, 138,9, 135,9, 135,8, 134,3, 132,6, 132,4, 131,2, 130,5, 130,4, 130,3, 129,2, 128,0, 127,9, 102,4, 97,5, 90,0, 82,44, 82,39, 74,4, 58,2, 26,7, 19,1; МСВР (ИЭР) m/z рассчитано для $\text{C}_{34}\text{H}_{33}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}^-$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 751,0480 $[\text{M} - \text{H}]^-$, найдено m/z 753,6495.

Синтез 7b-E и 7b-Z

К безводному раствору соединения **6b** (6,11 г, 8,1 ммоль) в ДМФА (35 мл) добавляли диметилфосфит (2,97 мл, 34,0 ммоль) и триэтиламин (2,26 мл, 17,0 ммоль) при 0°C, и затем перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После разбавления раствора этилацетатом органический раствор промывали водн. насыщ. NH_4Cl и раствором соли. Затем органический раствор сушили над MgSO_4 , фильтровали и выпаривали, и полученный неочищенный материал неоднократно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/этилацетат, 9:1-1:1) до тех пор, пока все чистые изомерные соединения не были собраны по отдельности с получением соединения **7b-E** (3,0 г, 55%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,89-7,87 (м, 2H), 7,70-7,62 (м, 5H), 7,51-7,39 (м, 8H), 7,10 (д, 1H, $J_{\text{HH}}=8,3$ Гц), 6,47 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=13,6$, 0,8 Гц), 6,01 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=13,6$, 7,9 Гц), 5,76-5,74 (м, 2H), 4,51 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,8$, 7,8 Гц), 7,36 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,8$ Гц, 4,9 Гц), 3,34 (с, 3H), 3,17 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=4,7$, 1,2 Гц), 1,09 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 168,3, 161,7, 148,7, 138,4, 135,9, 135,8, 135,3, 133,8, 132,6, 132,4, 131,2, 130,5, 130,4, 130,3, 129,2, 128,0, 127,9, 112,1, 102,3, 88,9, 82,8, 82,6, 77,2, 74,2, 58,1, 26,8, 19,1; и **7b-Z** (1,23 г, 22%); ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 7,89-7,87 (м, 2H), 7,72-7,70 (м, 2H), 7,68-7,63 (м, 3H), 7,51-7,44 (м, 4H), 7,41-7,37 (м, 4H), 7,16 (д, 1H, J - 8,2 Гц), 6,53 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=7,4$, 0,6 Гц), 6,03 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=8,5$, 7,4 Гц), 5,75- 5,73 (м, 2H), 5,12 (т, 1H, $J_{\text{HH}}=8,1$ Гц), 3,93 (дд, 1H, $J_{\text{HH}}=6,9$, 5,0 Гц), 3,32 (ш, 1H), 3,26 (с, 3H), 1,10 (с, 9H); ^{13}C ЯМР (126 Гц, CDCl_3) δ 168,3, 161,8, 148,7, 139,3, 135,91, 135,85, 135,22, 132,74, 132,71, 131,2, 130,8, 130,5, 130,23, 130,16, 129,2, 127,78, 127,75, 114,6, 102,2, 90,1, 82,4, 80,6, 77,2, 74,8, 58,1, 26,8, 19,2.

Синтез соединения 8b

Безводный 5'-O-DMTr-2'-дезоксид-2'-фтор-3'-[метил-N, N-(диизопропил)амино]фосфорамидит (4,26 г, 6,0 ммоль) растворяли в 0,45 М 1H-тетразола/раствора CH_3CN (27 мл, 12 ммоль) и перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. К этому раствору добавляли H_2O (3,6 мл) и перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. После разбавления этилацетатом, органический раствор шесть раз промывали раствором соли, сушили над MgSO_4 , фильтровали и затем выпаривали. Полученное соединение **8b** с небольшим количеством примесей использовали для следующей реакции без дополнительной очистки; ^{31}P ЯМР (CDCl_3 , 202 МГц) δ 8,92, 8,28.

Синтез соединения 9b

Безводное соединение **7b-E** (2,84 г, 4,20 ммоль) и $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (188,6 мг, 0,84 ммоль) и [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий (II) (931,4 мг, 1,68 ммоль) продували аргоном и затем растворяли в безводном ТГФ (50 мл). После добавления пропиленоксида (2,94 мл, 42,0 ммоль) одной порцией добавляли соединение **9b** (3,16 г,

5,04 ммоль) и перемешивали в течение 4 часов при 70°C. После удаления растворителя при пониженном давлении неочищенную смесь очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (гексан-этилацетат, 50:50-0:100) и полученные фракции, содержащие соединение **9b**, дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1%ТЭА-CH₂Cl₂/MeOH, 0% - 5%) с получением соединения **9b** в виде смеси диастереоизомеров (3,3 г, 64%); ³¹P ЯМР (202 МГц, CDCl₃) δ 19,31, 18,72.

Синтез соединения 10b

К соединению **9b** (3,3 г, 2,70 ммоль) в безводном ТГФ (36,5 мл) добавляли 1,0 М ФТБА-ТГФ (4,05 мл, 4,05 ммоль) и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 минут. После разбавления CH₂Cl₂ (150 мл), органический слой промывали раствором соли, сушили над MgSO₄, фильтровали и затем выпаривали. Полученный неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1% ТЭА-CH₂Cl₂/MeOH, 0-8%) с получением соединения **10b** (1,25 г, 47%); ³¹P ЯМР (202 МГц, CDCl₃) δ 19,8, 19,1.

Синтез соединения 11b

Соединение **10b** (393,2 мг, 0,4 ммоль) обезвоживали повторным совместным выпариванием с безводным CH₃CN и затем растворяли в безводном CH₂Cl₂ (4,0 мл). К этому раствору при 0°C добавляли N, N-диизопропилэтиламин (0,21 мл, 1,2 ммоль) и 2-цианоэтил-N, N-диизопропилхлорфосфорамидит (0,11 мл, 0,48 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин при 0°C реакционную смесь разбавляли избытком CH₂Cl₂. Органический слой неоднократно промывали водн. насыщ. NaHCO₃, сушили над MgSO₄, фильтровали и выпаривали. Полученный неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле (1% ТЭА-CH₂Cl₂/MeOH, от 100% до 4%) с получением соединения **11b** в виде белой пены (319,6 мг, 68%); ³¹P ЯМР (202 МГц, CDCl₃) δ 150,7, 150,4, 150,3, 19,9, 19,5, 19,4, 18,8.

Пример 8: Опосредованный твердой подложкой синтез винилфосфонат-модифицированных олигонуклеотидов

Типовой синтез олигонуклеотида, имеющего винилфосфинат-модифицированные межсубъединичные связи, проиллюстрирован на **ФИГ. 22**. Примеры синтезированных VP-модифицированных последовательностей можно найти на **ФИГ. 28A** и **28B**.

Синтез интернуклеотидных (E)-винилфосфонат-модифицированных РНК олигонуклеотидов.

Синтез РНК олигонуклеотидов, содержащих одну винилфосфонатную связь, проводили на автоматическом синтезаторе РНК MerMade 12 (BioAutomation) с использованием 0,1 М безводного раствора CH₃CN 2'-модифицированного (2'-фтор, 2'-О-метил)фосфонамидита и винилфосфонат-связанных димерных фосфорамидитов. Для твердой подложки использовали подложку UnyLinker (ChemGenes). Синтез проводили по стандартной 1,0 мкмоль шкале цикла синтеза РНК фосфорамидита, который состоит из (i) детритилирования, (ii) связывания, (iii) экпирования и (iv) окисления йода. В качестве фосфорамидитаного активирующего агента использовали 5-(бензилтио)-1Н-тетразол в

безводном CH_3CN , и для детритилирования использовали 3% дихлоруксусную кислоту в CH_2Cl_2 . Для реакции кэпирования использовали 16% N-метилимидазол в тетрагидрофуране (Сар А) и 80:10:10 (об/об/об) тетрагидрофуран- Ac_2O -2,6-лутидин (Сар В). 0,02 М I_2 в ТГФ-пиридине- H_2O (7:2:1, об/об/об) использовали для окисления, и 0,1 М 3-[(диметиламинометилен)амино]-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион в пиридине: CH_3CN (9:1, об/об) использовали для сульфирования. Для 5'-концевого фосфорилирования использовали бис(2-цианоэтил)-N, N-диизопропилфосфорамидит. Для синтеза 3'-холестерин-модифицированного олигонуклеотида РНК использовали холестерин 3'-IscA CPG 500Å (ChemGenes), и синтез РНК проводили в тех же условиях, что и условия, используемые для VP-модифицированных РНК. После удлинения химической цепи, снятие защиты и отщепление от твердой подложки проводили с помощью NH_4OH -EtOH (3:1, об/об) в течение 48 часов при 26°C. В случае винилфосфонат-модифицированной РНК, РНК на твердой подложке сначала обрабатывали TMSBr-пиридином- CH_2Cl_2 (3:1:18, об/об/об) в течение 1 ч при температуре окружающей среды в колонке для синтеза РНК. Затем твердую подложку промывали водой (1 мл x 3), CH_3CN (1 мл x 3) и CH_2Cl_2 (1 мл x 3) пропусканием раствора через колонку для синтеза, и затем сушили в вакууме. После переноса твердой подложки в пробирку с завинчивающейся крышкой, проводили обработку основания смесью NH_4OH -EtOH (3:1, об/об) в течение 48 ч при 26°C. Неочищенный олигонуклеотид РНК без конъюгата холестерина очищали стандартной анионообменной ВЭЖХ, тогда как РНК с конъюгатом холестерина очищали ВЭЖХ с обращенной фазой. Все полученные очищенные РНК были обессолены на Sephadex G-25 (GE Healthcare) и охарактеризованы масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ИЭР-МС).

Пример 9: Эффективность сайленсинга

На **ФИГ. 23** и **24** представлены визуальные изображения VP-модифицированной миРНК, изучаемой в настоящем документе. На **ФИГ. 25** представлено действие, которое одна или несколько винилфосфонатных модификаций в межсубъединичной связи в различных положениях направляющей цепи оказывают на сайленсинг. Как видно из данных на **ФИГ. 25**, RISC очень чувствителен к VP модификации, и наличие пары оснований с нарушением комплементарности в различных положениях может нарушить эффективность миРНК.

На **ФИГ. 26**, **27А** и **27В** также показана способность VP-модифицированной миРНК подавлять мутантный аллель. Как видно из **ФИГ. 27А** и **27В**, добавление нарушения комплементарности в последовательность миРНК может улучшить распознавание аллелей, не влияя на сайленсинг мутантных аллелей. На **ФИГ. 30** показано, что введение VP-модифицированной связи рядом с сайтом SNP значительно усиливало дискриминацию минеш/вне мишени SNP-селективных миРНК. Соединения, содержащие первичные (положение 6) и вторичные (положение 11) SNP, синтезировали с или без модификации VP между положениями 5 и 6. Как видно на **ФИГ. 30**, присутствие VP-модификации не влияло на активность «на мишени», но полностью устраняло любой

обнаруживаемый сайленсинг для мРНК вне мишени. Способ создания данных на **ФИГ. 25, 26, 27А и 27В** описывается ниже.

Пассивная доставка hsiРНК

Клетки высевали в модифицированную по Дульбекко среду Игла, содержащую 6% FBS, по 8000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах для культивирования клеток. hsiРНК разбавляли вдвое к конечной концентрации в OptiMEM (Carlsbad, CA; 31985-088) и 50 мкл разбавленной hsiРНК добавляли к 50 мкл клеток, что приводило к конечному 3% FBS. Клетки инкубировали в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂. Максимальная доза в исследованиях доза-ответ in vitro составляла 1,5 мкМ соединения.

Способ количественного анализа мРНК-мишени

мРНК количественно определяли из клеток с использованием набора для анализа QuantiGene 2.0 (Affymetrix, QS0011). Клетки лизировали в 250 мкл разведенной лизирующей смеси, состоящей из одной части лизирующей смеси (Affymetrix, 13228), двух частей H₂O и 0,167 мкг/мкл протеиназы К (Affymetrix, QS0103) в течение 30 мин при 55°C. Клеточные лизаты тщательно перемешивали и добавляли по 40 мкл каждого лизата на лунку планшета для захвата с 20 мкл разведенной лизирующей смеси без протеиназы К. Наборы зондов для НТТ и HPRT человека (Affymetrix; # SA-50339, SA-10030) разводили и использовали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Наборы данных были нормализованы к HPRT.

Способ создания гистограммы.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Зависимые от концентрации кривые IC₅₀ строили с использованием log(ингибитор) к ответу - переменный наклон (четыре параметра). Для каждого планшета для обработки клеток, уровень нокдауна при каждой дозе нормализовали к среднему значению контрольной группы (необработанной группы). Нижний предел кривой был установлен на значение менее 5, а верхний предел кривой был установлен на значение более 95. Для создания гистограммы процентное различие рассчитывали путем вычитания значения IC₅₀ для каждого соединения из значения IC₅₀ для каждого соответствующего контрольного соединения, деления на значение IC₅₀ для контрольного соединения и умножения на 100. Если процентное различие было меньше -500%, процентное различие искусственно устанавливали равной -500%. Нижняя граница графика была срезана на -300%.

Содержание всех цитируемых ссылок (включая ссылки на литературу, патенты, патентные заявки и веб-сайты), которые могут цитироваться в данной заявке, настоящим прямо включено посредством ссылки во всей их полноте для любых целей, как и цитируемые там ссылки. В описании будут использоваться, если не указано иное, общепринятые методы иммунологии, молекулярной биологии и клеточной биологии, которые хорошо известны в данной области техники.

Описание может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты

осуществления, во всех отношениях следует рассматривать как типовые, а не ограничивающие описание. Таким образом, объем описания определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и поэтому предполагается, что все изменения, подпадающие под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, включены в настоящее описание.

Пример 10. Первичный скрининг дает несколько эффективных последовательностей миРНК для гетерозиготности SNP rs362307

Все миРНК, сконструированные таким образом, чтобы быть комплементарными мРНК НТТ, содержащей альтернативный мутантный SNP (rs362307) (ФИГ. 39) подвергали скринингу с репортерными плазмидами, содержащими область-мишень для представляющего интерес SNP (ФИГ. 40). Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, обратно трансфицировали 1,5 мкМ hsiРНК путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Число, следующее за SNP, представляет положение SNP в миРНК. Ожидалось, что это SNP будет труднее таргетировать из-за высокого содержания G/C в окружающей его области. По-видимому, размещение SNP в положении 3 представляет наибольшую дискриминацию SNP без потери эффективности в отношении мутантного аллеля, показывая, что наилучшее положение SNP является сиквенс-специфическим (ФИГ. 41). Таким образом, этот первичный процесс скрининга может выполняться для выбора наилучшего положения SNP для любого SNP.

Пример 11. Применительно к SNP rs362307 вторичное нарушение комплементарности продолжает улучшать распознавание аллелей

Как показано на ФИГ. 42, первичный скрининг новых последовательностей с нарушениями комплементарности, введенными во все возможные положения, также дает множество эффективных hsiРНК с повышенной дискриминацией SNP в положении rs362307. Введение нарушения комплементарности в положения 7 и 8, по-видимому, увеличивает селективность при сохранении эффективности сайленсинга мишени. Другие вторичные нарушения комплементарности обеспечивали превосходную дискриминацию, но в целом меньшую активность.

Пример 12: Измерение SNP дискриминации в последовательностях, включающих SNP

Для измерения SNP дискриминации по каждой из последовательностей, представленных в таблицах 5-7 (т. е. каждой hsiРНК, имеющей конкретную комбинацию нуклеотида в положении SNP и нуклеотида в положении нарушения комплементарности (ММ)), репортерные плазмиды psiCHECK, содержащие либо область дикого типа htt, либо такую же область htt с SNP последовательности, получали и тестировали с использованием двойной люциферазы. Клетки HeLa, трансфицированные одной из двух репортерных плазмид, обратно трансфицировали hsiРНКs путем пассивного поглощения и обрабатывали в течение 72 часов. Активность люциферазы измеряли в анализах с или без дополнительного нарушения комплементарности, и затем наносили на кривые доза-ответ и сравнивали, чтобы выявить последовательности, дающие наилучшие результаты с точки

зрения дискриминации и эффективности сайленсинга.

Пример 13: Синтез фосфинат-модифицированной межсубъединичной связи

Способ получения фосфинат-модифицированной межсубъединичной связи обобщен на **ФИГ. 44А-44С**. Этот способ включает окисление Джонса из свободного спирта в соответствующий кетон с последующим олефинированием по Виттигу для получения экзометиленовой группы, показанной в промежуточном соединении **3**. Защита амида с помощью ВОР с последующим гидроборированием-окислением дает промежуточный свободный спирт **5**. Мезилирование с последующей модифицированной реакцией Финкельштейна дает йодированное промежуточное соединение **7**, которое затем подвергли дальнейшей функционализации с получением мономера метилфосфината **9**.

Для получения мономера **18** использовали различные стадии защиты и снятия защиты для получения промежуточного соединения **13**. Окисление IBX дает соответствующий кетон с последующим олефинированием Виттига для получения метилена. И снова гидроборирование-окисление с последующим мезилированием и реакцией Финкельштейна дает мономер **18**.

Объединение мономеров **9** и **18** в основных условиях дает фосфинат-связанный димер **19**. Опосредованное кислотой и катализируемое по Перлману снятие защиты с последующей дальнейшей функционализацией фосфанамином дает димер **22**.

Пример 14: Изменение содержания 2'-ОМе/2'-F для модификации эффективности и дискриминации

Путем изменения паттерна модификации 2'-О-метил/фторного остова вокруг SNP и сайта нарушения комплементарности модифицировали эффективность и дискриминацию миРНК (**ФИГ. 48А-48D**). Тяжелое 2'-фторирование рядом с положением SNP улучшало связывание с мишенью, но уменьшало дискриминацию мишени. Последующее добавление тяжелого 2'-О-метилирования вокруг нарушения комплементарности восстановило дискриминацию, потерянную из-за фторирования. Хотя исходный паттерн химической модификации, описанный *выше*, был полезен для исследования *in vivo*, методика, описанная в этом примере, может быть использована для тонкой настройки SNP-таргетных соединений, описанных в настоящем документе, и для идентификации дополнительных новых SNP-таргетных соединений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, содержащая:

- (a) 5' конец и 3' конец;
- (b) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;
- (c) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP является комплементарным аллельному полиморфизму;
- (d) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене; и
- (e) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (X) по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый X расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP.

2. Нуклеиновая кислота, содержащая:

- (a) 5' конец и 3' конец;
- (b) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;
- (c) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP является комплементарным аллельному полиморфизму;
- (d) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене; и
- (e) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (Y) по обе стороны от нуклеотида в положении MM, где каждый Y расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

3. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что X содержит сахарную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метила (2'-OMe), 2'-фтора (2'-F), 2'-рибо, 2'-дезоксирibo, 2'-F-4'-тиоарабино (2'-F-ANA), 2'-О-(2-метоксиэтила) (2'-MOE), 4'-S-PHK, закрытой нуклеиновой кислотой (LNA), 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, 2'-О-цианоэтил-PHK (CNet-PHK), трицикло-ДНК, циклогексенилнуклеиновой кислоты (CeNA), арабинонуклеиновой кислоты (ANA) и гекситолнуклеиновой кислоты (HNA).

4. Нуклеиновая кислота по п.2, где Y содержит сахарную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-OMe, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирibo, 2'-F-ANA, 2'-MOE, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA.

5. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

6. Нуклеиновая кислота по п.1, отличающаяся тем, что X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP и непосредственно 3' к нуклеотиду в

положении SNP.

7. Нуклеиновая кислота по п.2, отличающаяся тем, что Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

8. Нуклеиновая кислота по п.2, отличающаяся тем, что Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

9. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца.

10. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

11. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

12. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) 5' конец и 3' конец;

(b) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;

(c) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP является комплементарным аллельному полиморфизму;

(d) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене;

(e) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (X) по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый X расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP; и

(f) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид (Y) по обе стороны от нуклеотида в положении MM, где каждый Y расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

13. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что X содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирibo, 2'-F-ANA, 2'-МОЕ, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA.

14. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что Y содержит модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из 2'-ОМе, 2'-F, 2'-рибо, 2'-дезоксирibo, 2'-F-ANA, 2'-МОЕ, 4'-S-PHK, LNA, 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, CNet-PHK, трицикло-ДНК, CeNA, ANA и HNA.

15. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что X расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

16. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что X расположен

непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP и непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

17. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

18. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что Y расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM.

19. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца.

20. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

21. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

22. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что X и Y содержат идентичные модификации нуклеотидов.

23. Нуклеиновая кислота по п.12, отличающаяся тем, что X и Y содержат разные модификации нуклеотидов.

24. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) 5' конец и 3' конец;

(b) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;

(c) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP), комплементарном аллельному полиморфизму;

(d) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене;

(e) по меньшей мере, один 2'-фтор-рибонуклеотид по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, где каждый 2'-фтор-рибонуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP; и

(f) по меньшей мере, один 2'-метоксирибонуклеотид по обе стороны от нуклеотида в положении MM, где каждый 2'-метоксирибонуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении MM.

25. Нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP или 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

26. Нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, и 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

27. Нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM или 2'-

метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении ММ.

28. Нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении ММ, и 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении ММ.

29. Нуклеиновая кислота по п.24, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP присутствует в области узнавания мишени, и где нуклеотид в положении ММ расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

30. Нуклеиновая кислота по п.29, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца, и где нуклеотид в положении ММ расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

31. Нуклеиновая кислота по п.24, содержащая три, четыре, пять или шесть 2'-фтор-рибонуклеотидов.

32. Нуклеиновая кислота по п.24, содержащая три, четыре, пять или шесть 2'-метоксирибонуклеотидов.

33. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) 5' конец и 3' конец;

(b) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;

(c) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP), комплементарном аллельному полиморфизму;

(d) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (ММ), которое является нарушением комплементарности с нуклеотидом в гене;

(e) по меньшей мере, три 2'-фтор-рибонуклеотида, расположенные в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP; и

(f) по меньшей мере, три 2'-метоксирибонуклеотида, расположенных в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении ММ.

34. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP или 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

35. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, и 2'-фтор-рибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP.

36. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении ММ, или 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении ММ.

37. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении ММ, и 2'-метоксирибонуклеотид расположен непосредственно 3' к нуклеотиду в положении ММ.

38. Нуклеиновая кислота по п.33, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP присутствует в области узнавания мишени, и где нуклеотид в положении ММ

расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

39. Нуклеиновая кислота по п.38, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца, и где нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP.

40. Молекула миРНК, содержащая смысловую цепь, комплементарную гену-мишени, и антисмысловую цепь, комплементарную смысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-39.

41. Молекула миРНК по п.40, где смысловая цепь имеет длину от 13 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов до 17 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

42. Молекула миРНК по п.40 или 41, отличающаяся тем, что антисмысловая цепь имеет длину от 18 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов до 22 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

43. Молекула миРНК по любому из пп.40-42, где смысловая цепь имеет длину 15 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

44. Молекула миРНК по любому из пп.40-42, где смысловая цепь имеет длину 16 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов, и антисмысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов или нуклеотидных аналогов.

45. Разветвленный олигонуклеотид, содержащий две или более молекул миРНК, ковалентно связанных друг с другом, где каждая молекула миРНК независимо представляет собой молекулу миРНК по любому из пп.40-44.

46. Разветвленный олигонуклеотид по п.45, где разветвленный олигонуклеотид содержит две молекулы миРНК, ковалентно связанные друг с другом.

47. Разветвленный олигонуклеотид по п.45 или 46, в котором молекулы миРНК ковалентно связаны друг с другом посредством линкера.

48. Двухцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая:

(а) первую цепь нуклеотидов, содержащую:

(i) 5' конец и 3' конец;

(ii) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;

(iii) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP комплементарен аллельному полиморфизму;

(iv) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое не комплементарно нуклеотиду в гене; и

(v) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид, расположенный по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, по обе стороны от нуклеотида в положении MM, или их комбинация; где каждый модифицированный нуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP или от нуклеотида в положении MM, соответственно;

(b) вторую цепь нуклеотидов, комплементарную первой цепи нуклеотидов.

49. Двухцепочечная нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что модифицированный нуклеотид содержит модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метила (2'-OMe), 2'-фтора (2'-F), 2'-рибо, 2'-дезоксирибо, 2'-F-4'-тиоарабино (2'-F-ANA), 2'-О-(2-метоксиэтила) (2'-MOE), 4'-S-РНК, закрытой нуклеиновой кислоты (LNA), 4'-SF-ANA, 2'-О-аллила, 2'-О-этиламина, 2'-О-цианоэтил-РНК (CNet-РНК), трицикло-ДНК, циклогексенилнуклеиновой кислоты (CeNA), арабинонуклеиновой кислоты (ANA), гекситолнуклеиновой кислоты (HNA) и их комбинации.

50. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что модифицированный нуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении SNP, непосредственно 3' к нуклеотиду в положении SNP или их смесь.

51. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что модифицированный нуклеотид расположен непосредственно 5' к нуклеотиду в положении MM, непосредственно 3' к нуклеотиду в положении MM, или их смесь.

52. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении SNP находится в положении от 2 до 6 от 5' конца первой цепи нуклеотидов.

53. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-11 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP первой цепи нуклеотидов.

54. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что нуклеотид в положении MM расположен в 2-6 нуклеотидах от нуклеотида в положении SNP первой цепи нуклеотидов.

55. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что модифицированные нуклеотиды включают идентичные нуклеотидные модификации, разные нуклеотидные модификации или их смесь.

56. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что первая цепь имеет длину от 13 до 17 нуклеотидов.

57. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что вторая цепь имеет длину от 18 до 22 нуклеотидов.

58. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что первая цепь имеет длину 15 нуклеотидов, и вторая цепь имеет длину 20 нуклеотидов.

59. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что первая цепь имеет длину 16 нуклеотидов, и вторая цепь имеет длину 20 нуклеотидов.

60. Нуклеиновая кислота по п.48, отличающаяся тем, что первая цепь содержит на 3-7 нуклеотидов больше, чем вторая цепь.

61. Разветвленный олигонуклеотид, содержащий две или несколько молекул миРНК, ковалентно связанных друг с другом, где каждая молекула миРНК содержит двухцепочечную нуклеиновую кислоту, содержащую:

(a) первую цепь нуклеотидов, содержащую:

(i) 5' конец, 3' конец;

(ii) область узнавания мишени, комплементарную области гена, содержащей аллельный полиморфизм;

(iii) нуклеотид в положении однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в положении внутри области узнавания мишени, где нуклеотид в положении SNP комплементарен аллельному полиморфизму;

(iv) нуклеотид в положении нарушения комплементарности (MM), которое не комплементарно нуклеотиду в гене; и

(v) по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид, расположенный по обе стороны от нуклеотида в положении SNP, по обе стороны от нуклеотида в положении MM, или их комбинация; где каждый модифицированный нуклеотид расположен в пределах четырех, трех или двух нуклеотидов от нуклеотида в положении SNP или от нуклеотида в положении MM, соответственно;

(b) вторую цепь нуклеотидов, комплементарную первой цепи нуклеотидов.

62. Разветвленный олигонуклеотид по п.61, где разветвленный олигонуклеотид содержит две молекулы миРНК, ковалентно связанные друг с другом.

63. Разветвленный олигонуклеотид по п.61, в котором молекулы миРНК ковалентно связаны друг с другом посредством линкера.

САЙТ SNP
↓

psiCHECK 2273-1 (A) (КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ)

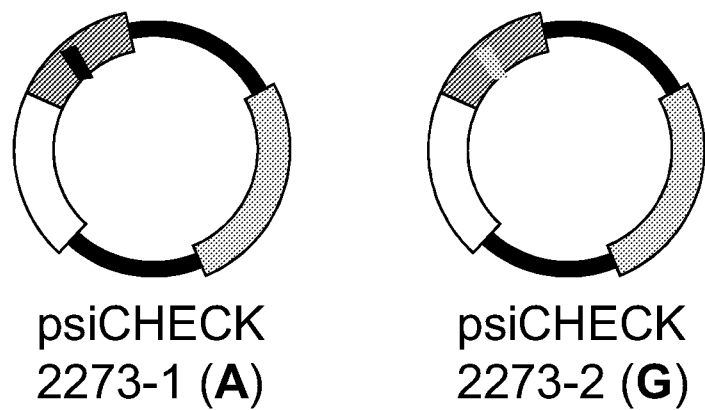
5'-tcgaAGCCACGAGAAGCTGCTGCTACAGATCAACCCCGAGCGGGA-3'

3'-TCGGTGCTCTTCGACGACGATGTCTAGTTGGGGCTCGCCCTccgg-5'

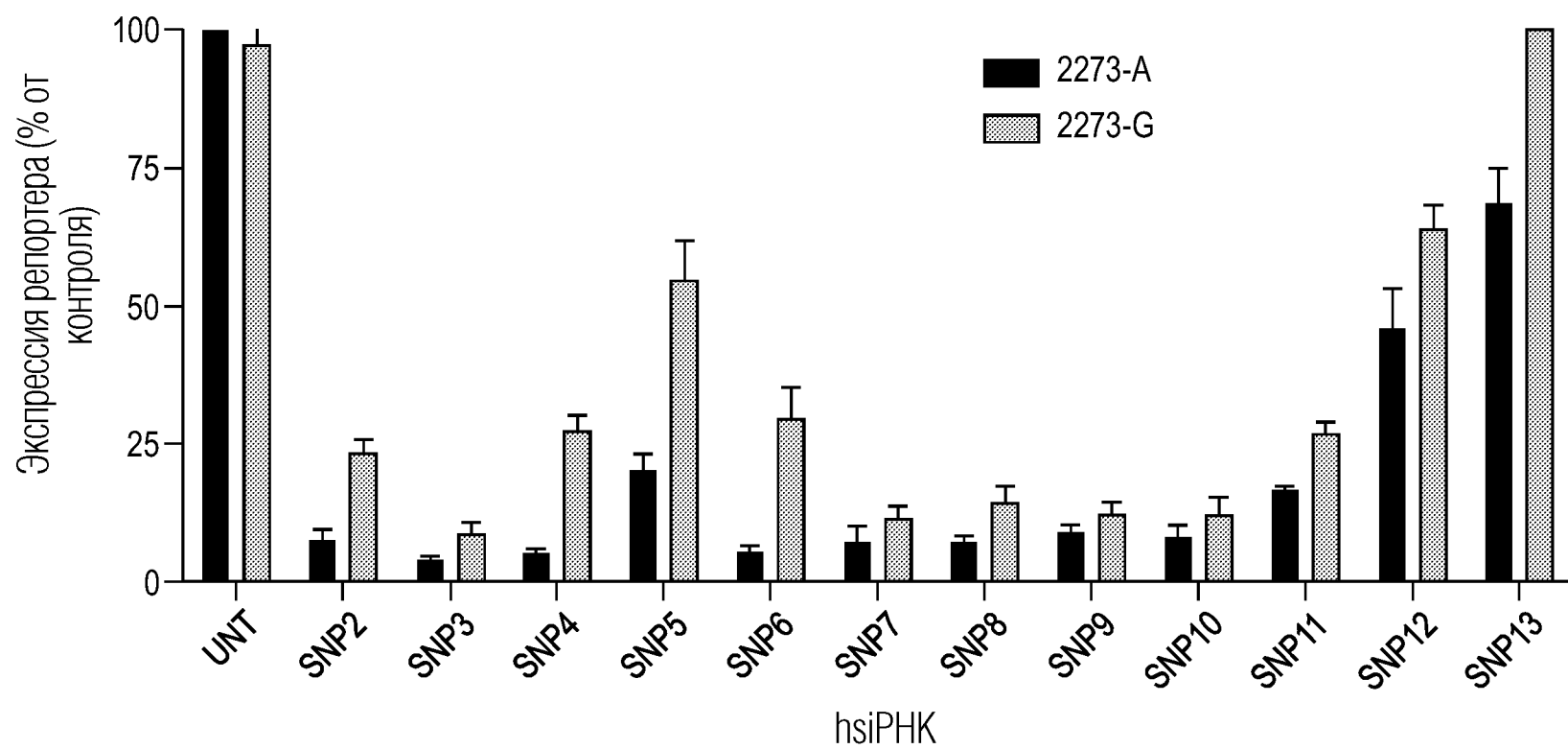
psiCHECK 2273-2 (G) (НАРУШЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ)

5'-tcgaAGCCACGAGAAGCTGCTGCTGCAGATCAACCCCGAGCGGGA-3'

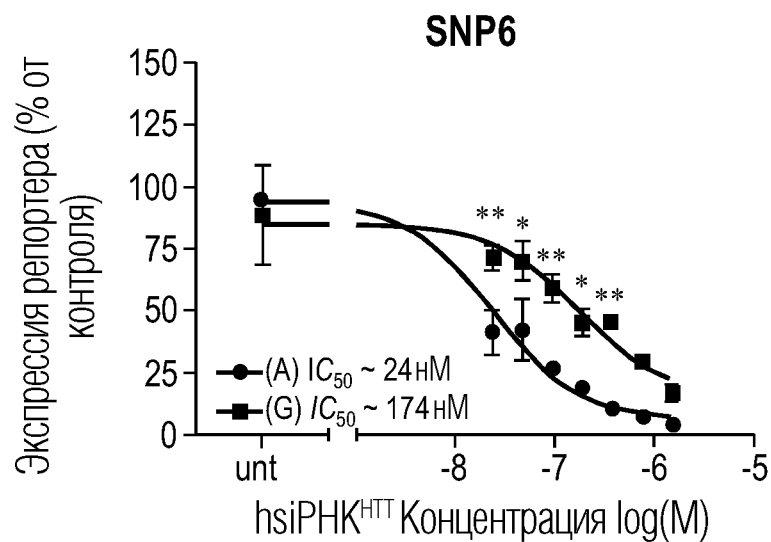
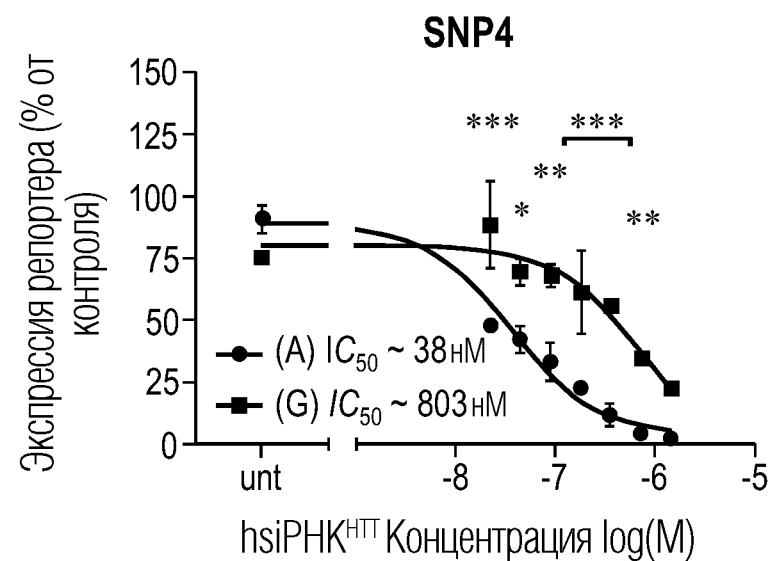
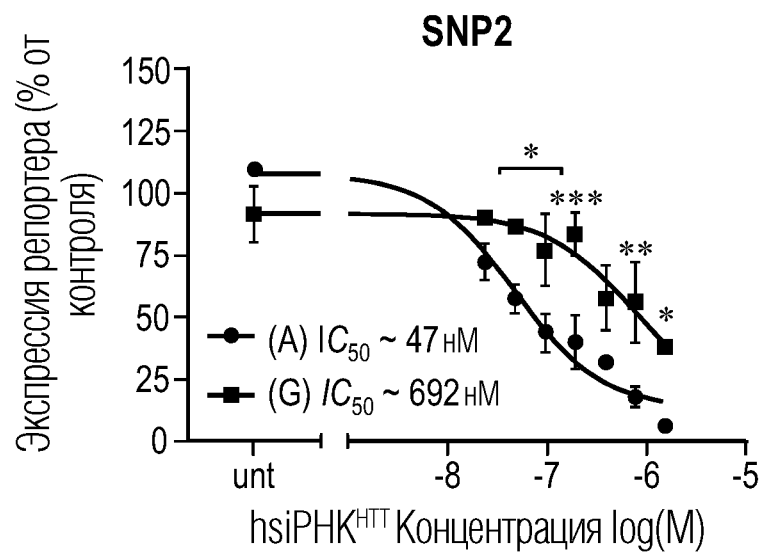
3'-TCGGTGCTCTTCGACGACGATGTCTAGTTGGGGCTCGCCCTccgg-5'



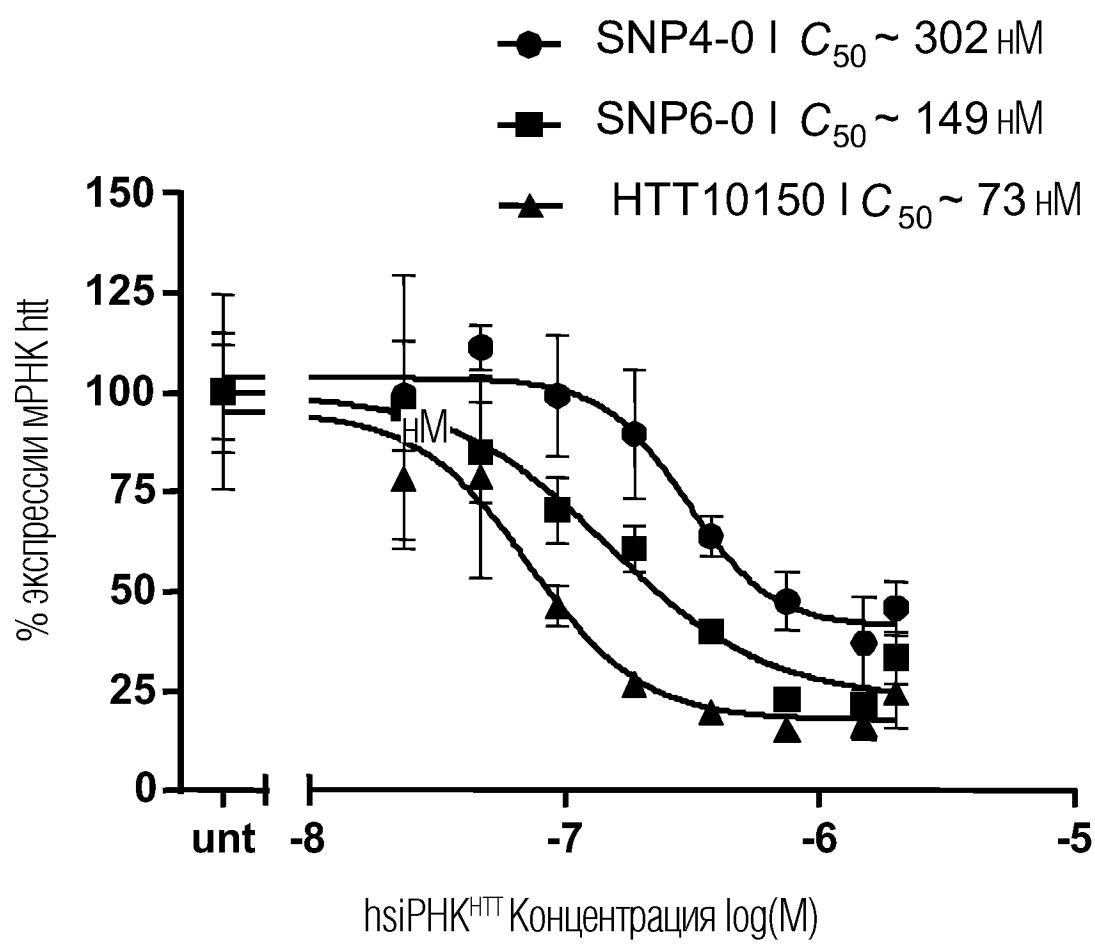
ФИГ. 1



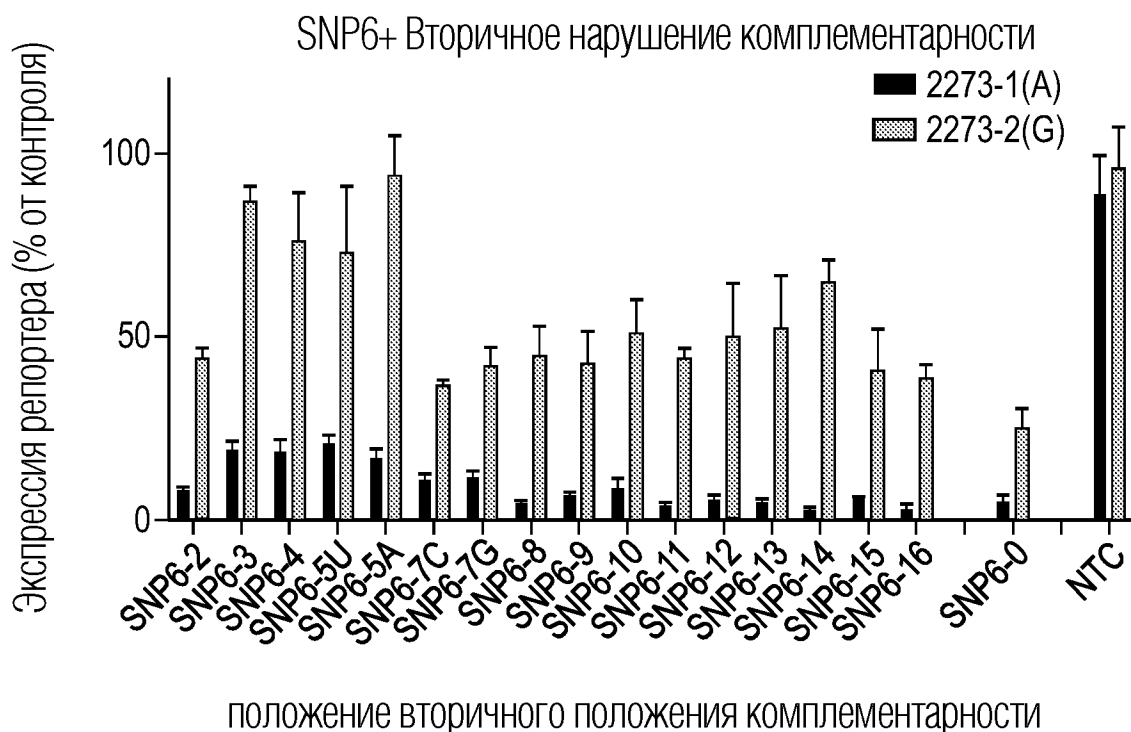
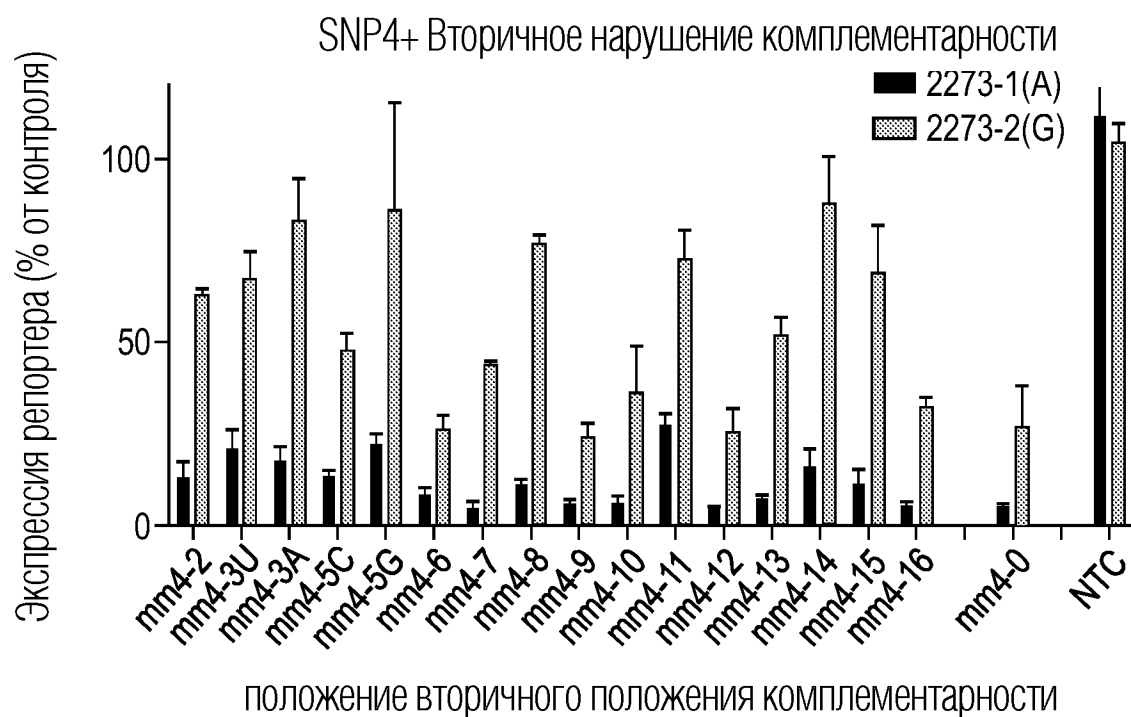
ФИГ. 2



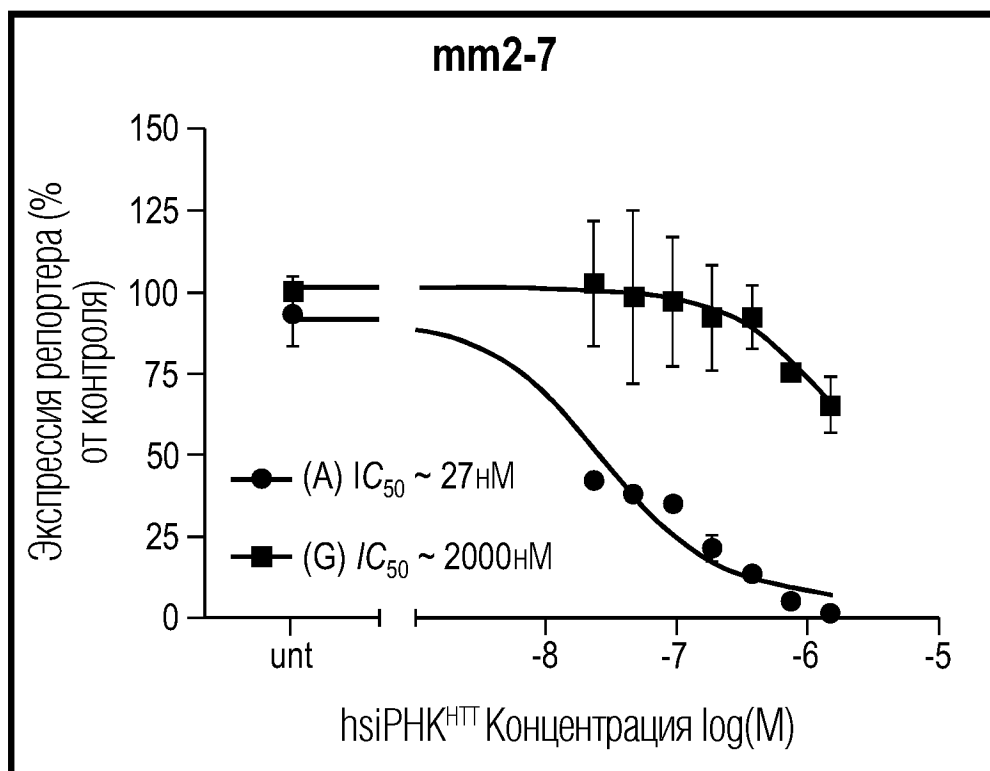
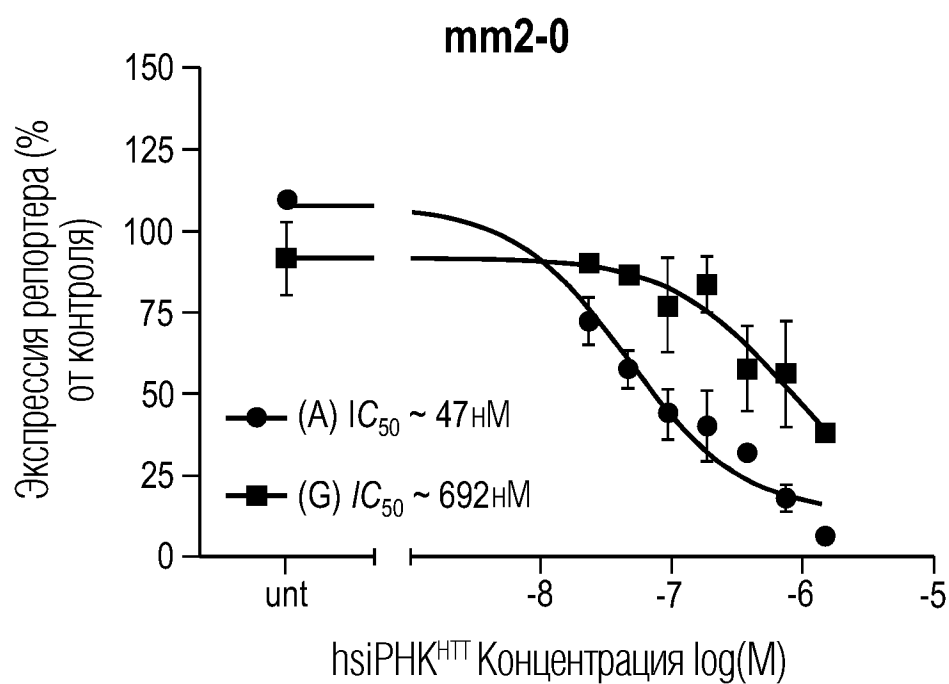
ФИГ. 3



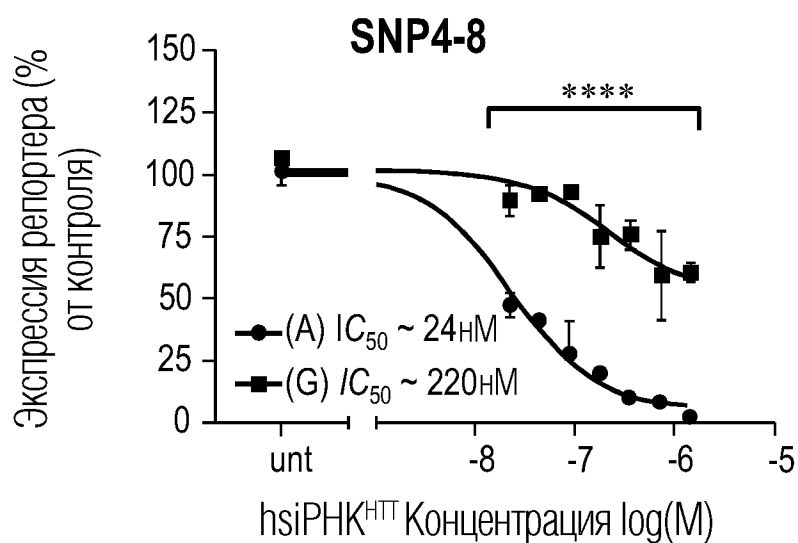
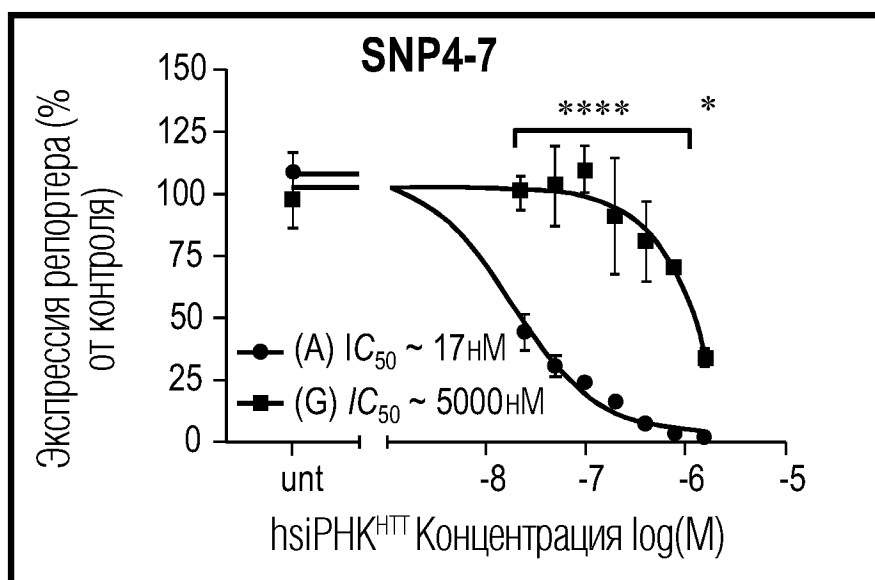
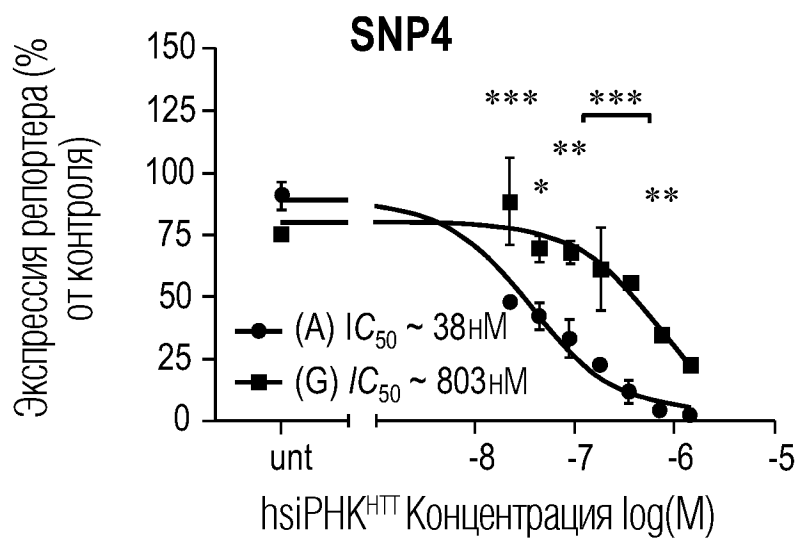
ФИГ. 4



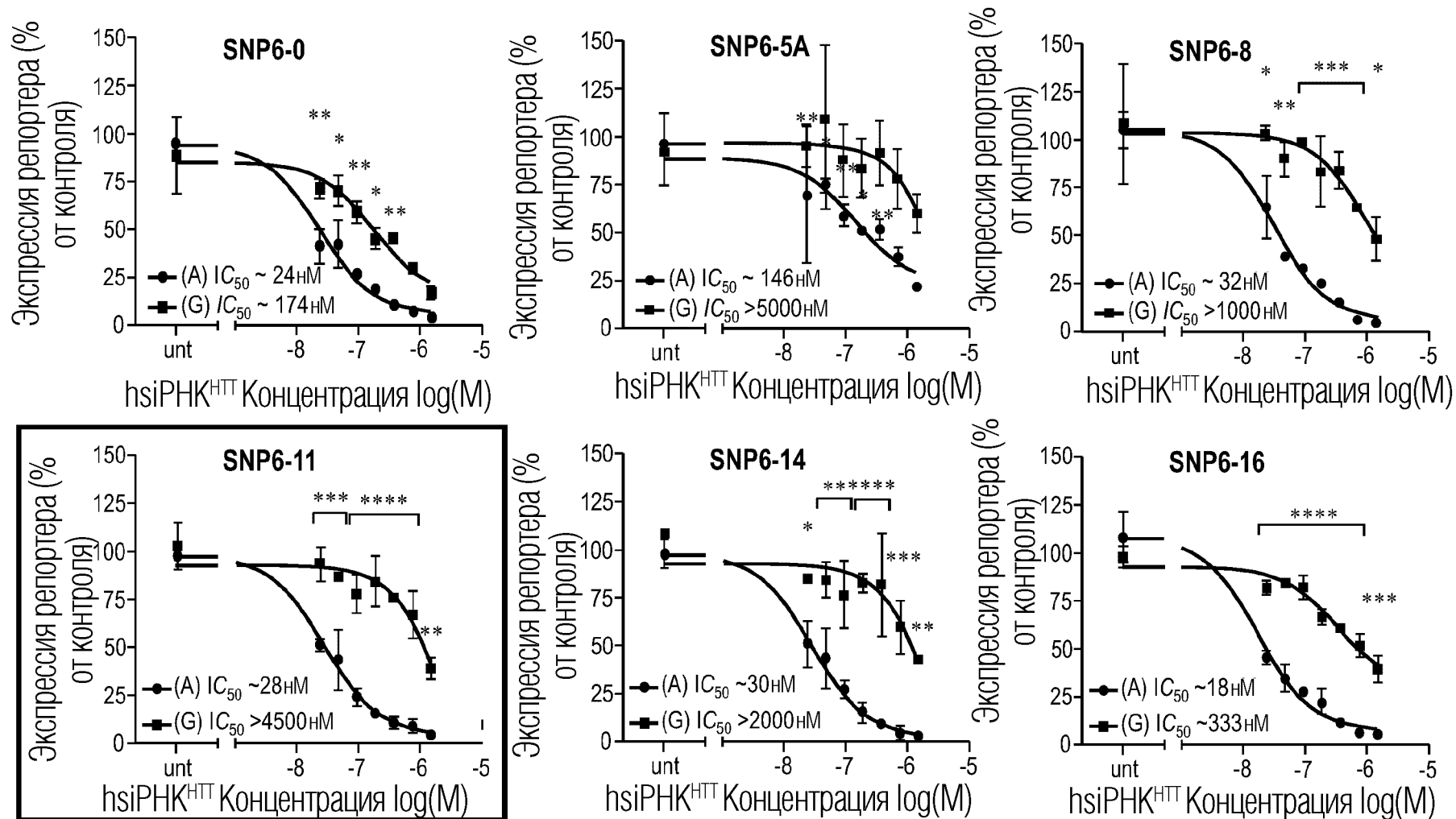
ФИГ. 5



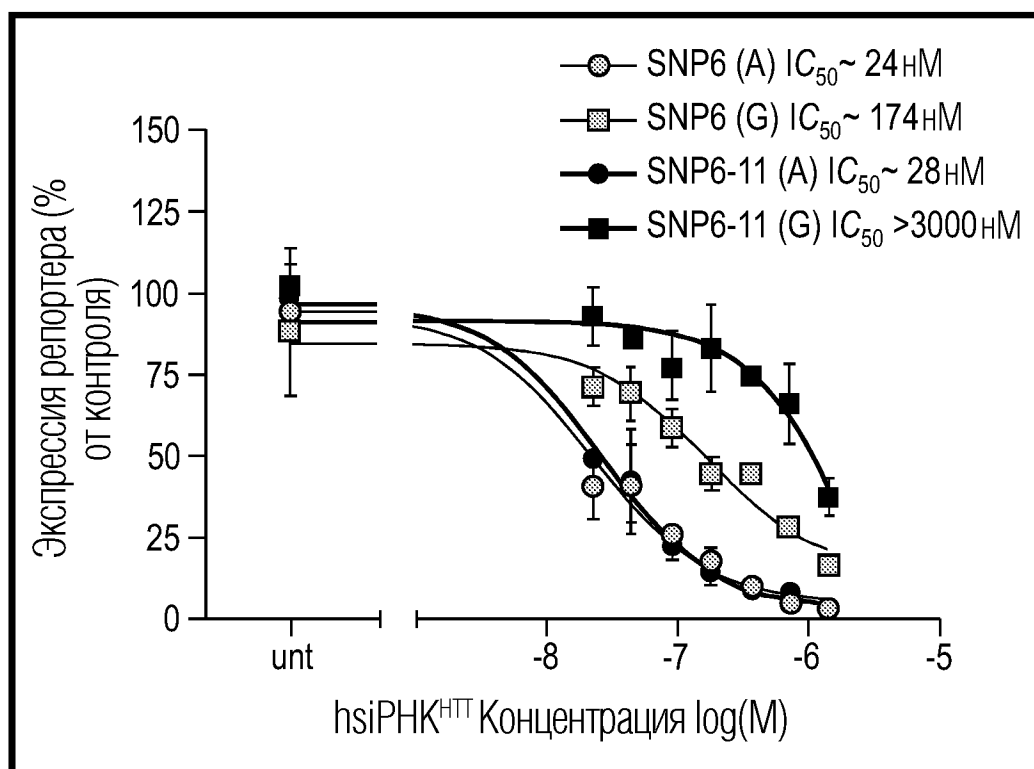
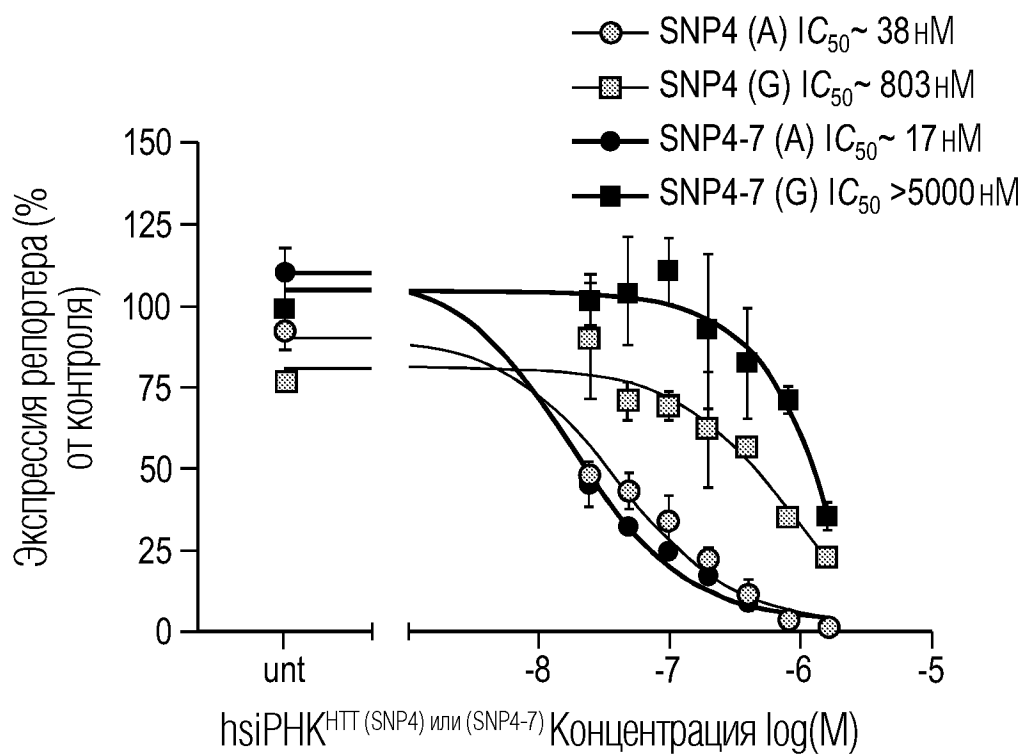
ФИГ. 6



ФИГ. 7

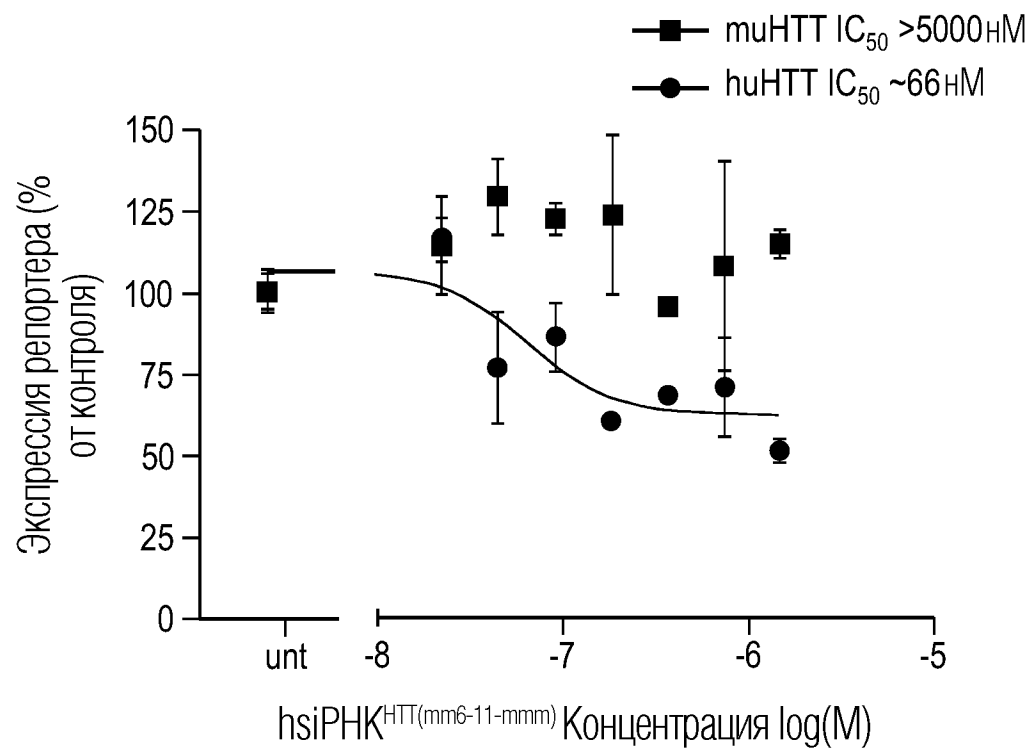
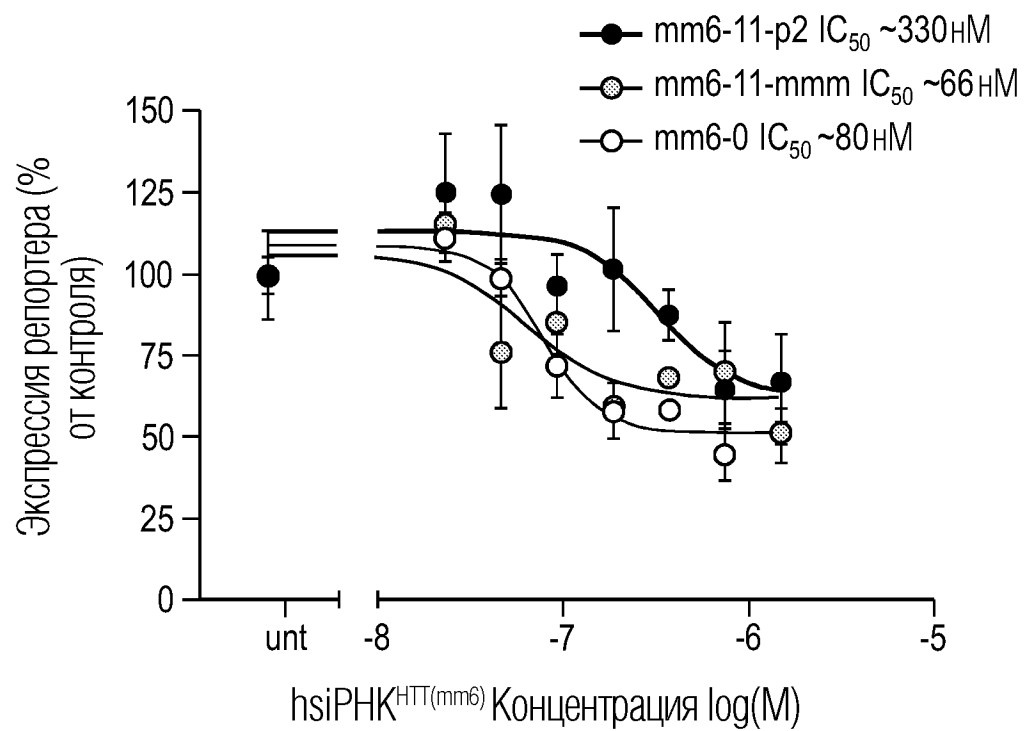


ФИГ. 8

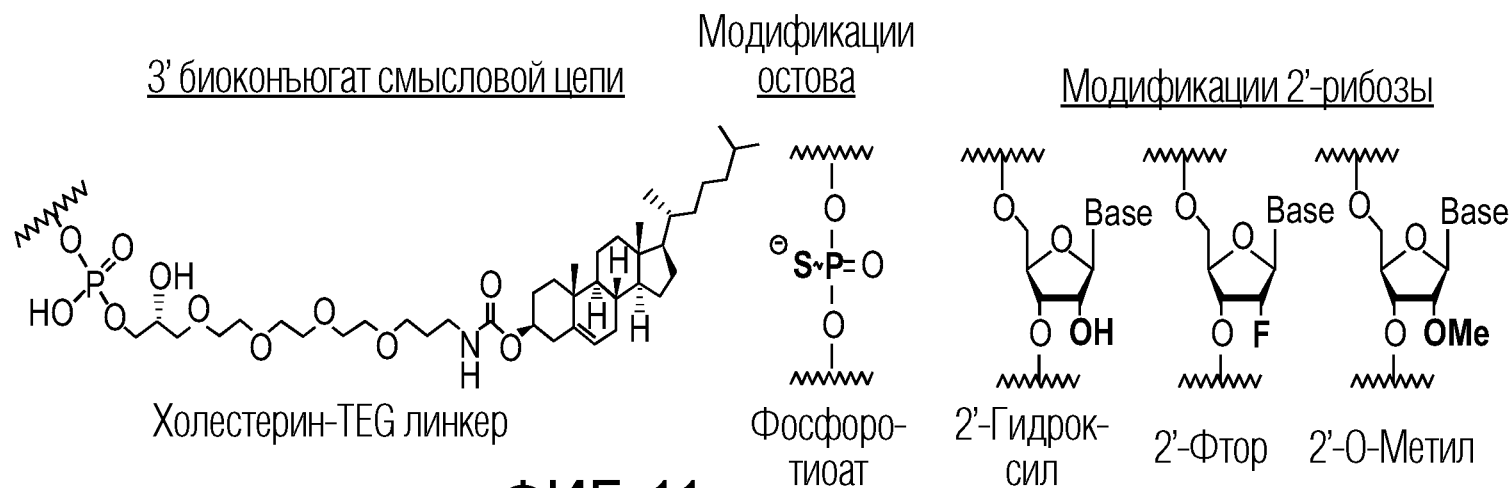
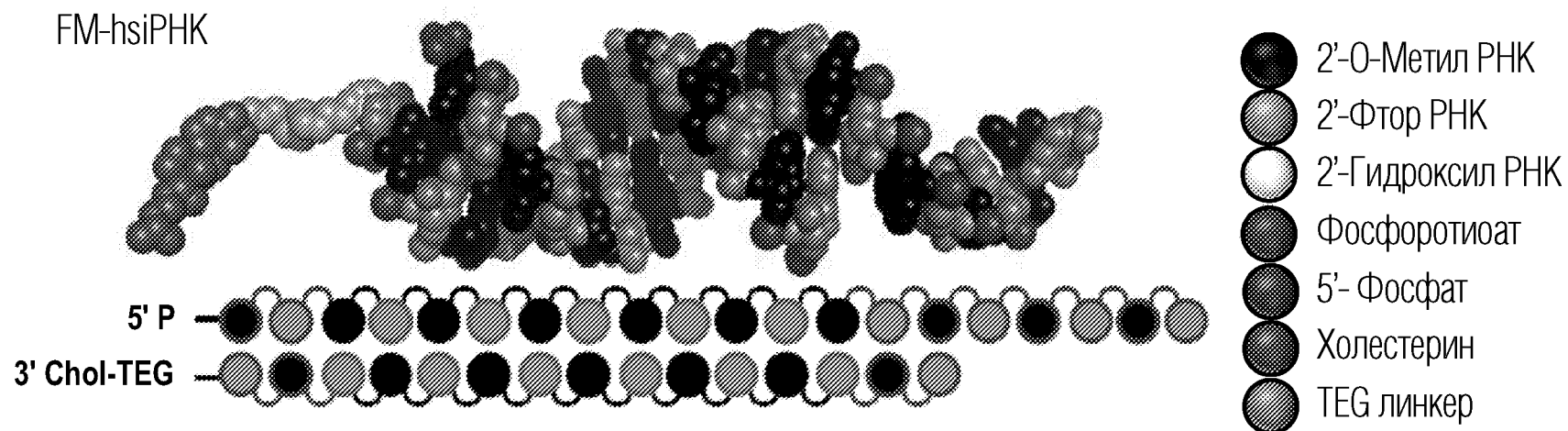


ФИГ. 9

10/57



ФИГ. 10



ФИГ. 11

mm2-3G	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-3U	P(mU)#(fU)#(mU)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-3C	P(mU)#(fU)#(mC)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-4	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-5	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-6	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-7	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mU)(fA)(mU)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-8	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fA)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-9	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-10	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fU)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-11	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mU)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-12	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-13	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mA)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-14	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fU)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-15	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mA)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
mm2-16	P(mU)#(fU)#(mG)(fG)(mC)(fC)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fU)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)

ФИГ. 12А

mm4-2	P(mU)#(fA)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-3U	P(mU)#(fU)#(mU)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-3A	P(mU)#(fU)#(mA)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-5C	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mC)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-5G	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mG)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-6	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fU)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-7	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-8	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-9	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-10	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-11	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-12	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fU)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-13	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mU)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-14	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fA)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-15	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mA)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
mm4-16	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fU)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)

ФИГ. 12В

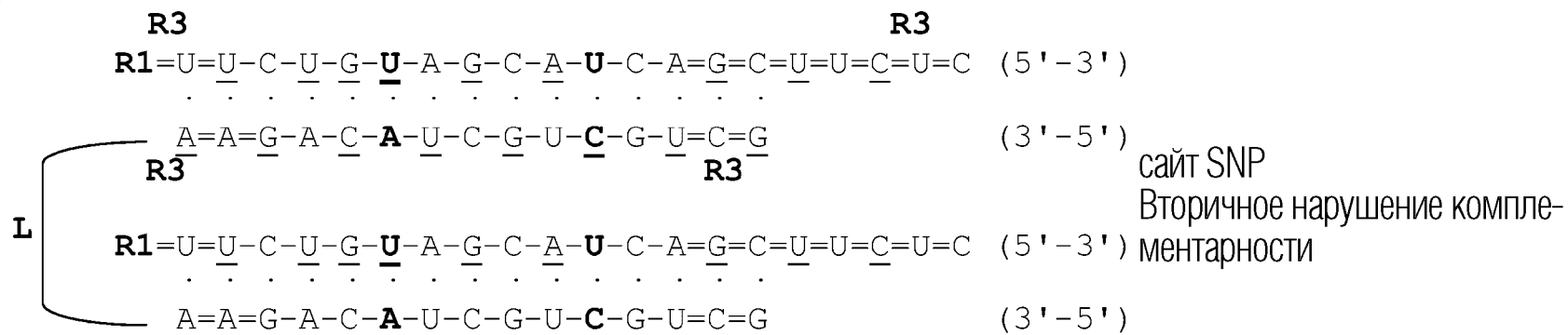
mm6-2	$P(mU)\#(\mathbf{fA})\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-3	$P(mU)\#(fU)\#(\mathbf{mU})(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-4	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(\mathbf{fA})(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-5U	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(\mathbf{mU})(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-5A	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(\mathbf{mA})(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-7C	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(\mathbf{mC})(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-7G	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(\mathbf{mG})(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-8	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(\mathbf{fU})(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-9	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(\mathbf{mU})(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-10	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(\mathbf{fU})(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-11	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(\mathbf{mU})(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-12	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(\mathbf{fU})(mA)\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-13	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(\mathbf{mU})\#(fG)\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-14	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(\mathbf{fU})\#(mC)\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-15	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(\mathbf{mU})\#(fU)\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$
mm6-16	$P(mU)\#(fU)\#(mC)(fU)(mG)(\mathbf{fU})(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)\#(fG)\#(mC)\#(\mathbf{fA})\#(mU)\#(fC)\#(mU)\#(fC)$

ФИГ. 12С

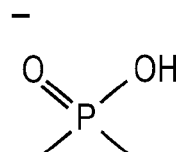
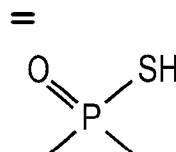
описание hsiPHK			последовательность/паттерн модификации	
Наименование соединения	положение snp	дополнительное положение нарушения комплементарности	антисмысловая цепь	смысловая цепь
mm2-7	2	7	P(mU)#(fU)#(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)(fU)#(mG)#(fG)	(fA)#(mG)#(fA)(mA)(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)#(mA)#(fA)-TegChol
mm4-7	4	7	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)	(fA)#(mA)#(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)#(mA)#(fA)-TegChol
mm4-8	4	8	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)	(fA)#(mA)#(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)#(mA)#(fA)-TegChol
mm4-15	4	15	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mA)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)	(fA)#(mA)#(fG)(mC)(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)#(mA)#(fA)-TegChol
mm6-5A	6	5	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mA)(fU)(mA)(fC)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)	(fG)#(mC)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)#(mA)#(fA)-TegChol
mm6-8	6	8	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fU)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)	(fG)#(mC)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)#(mA)#(fA)-TegChol
mm6-11	6	11	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)	(fG)#(mC)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)#(mA)#(fA)-TegChol
mm6-14	6	14	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fU)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)	(fG)#(mC)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)#(mA)#(fA)-TegChol
mm6-16	6	16	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fA)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)	(fG)#(mC)#(fU)(mG)(fC)(mU)(fG)(mC)(fU)(mA)(fC)(mA)(fG)#(mA)#(fA)-TegChol
красный=положение SNP синий= дополнительное положение нарушения комплементарности				

ФИГ. 13

ФИГ. 14



х- 2'-деокси-2'-фтор

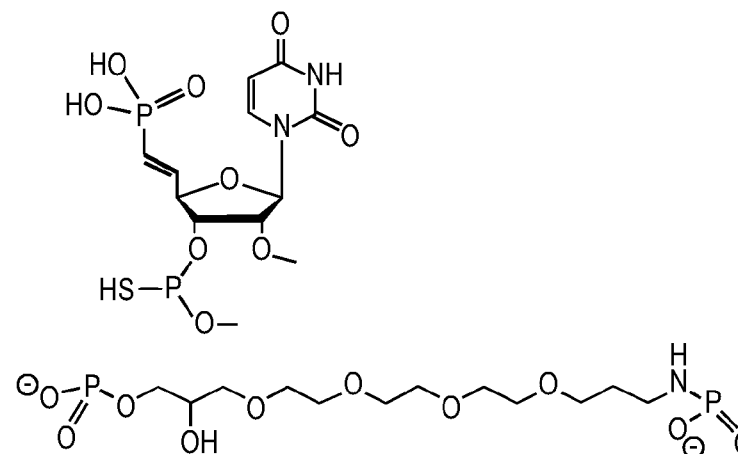


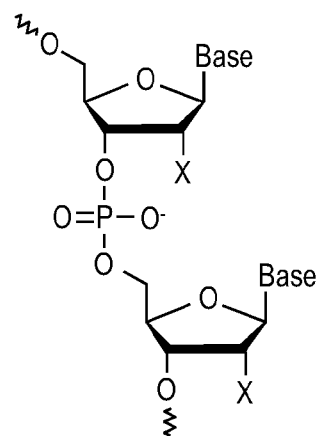
ж- 2'-О-метил

R1=5 ' -E-VP-mU

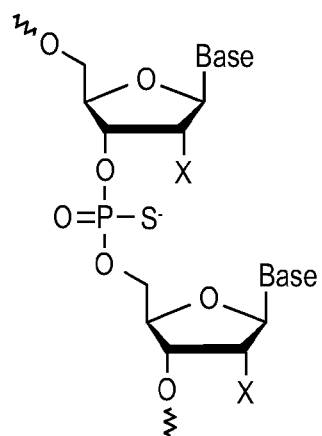
$C_{12}H_{18}N_2O_9P_2S$, Молекулярная масса: 428.29

L=3 - TEG фосфорамидат

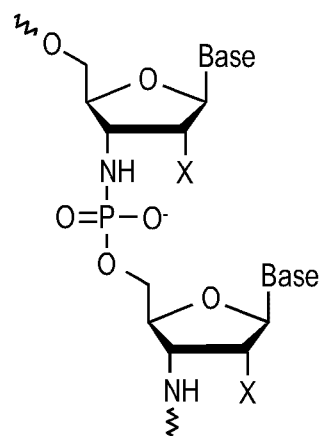
$$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_{10}\text{P}_2^{2-}, \quad \text{Молекулярная масса: } 405.28$$




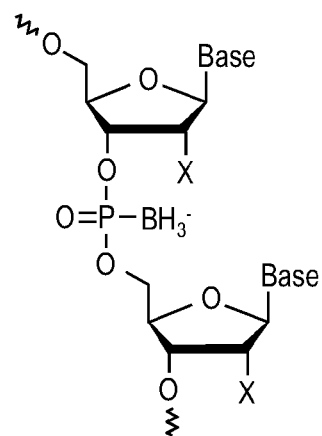
Фосфодиэфир



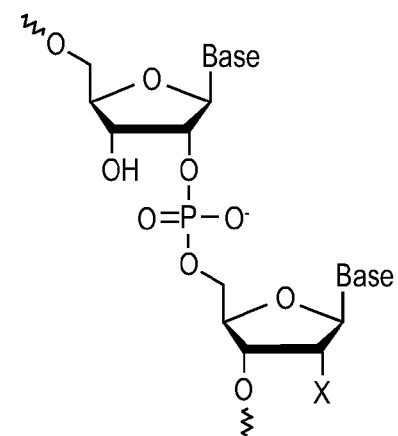
Фосфоротиоат



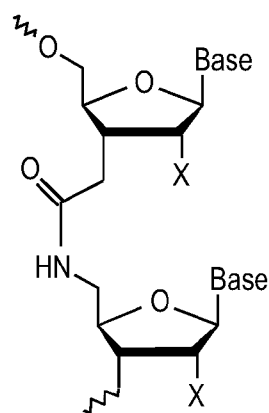
Фосфорамидат



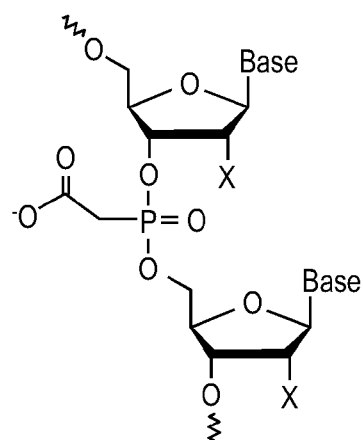
Боранофосфат



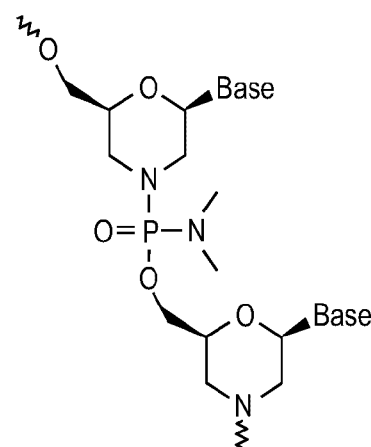
2',5'-Фосфодиэфир



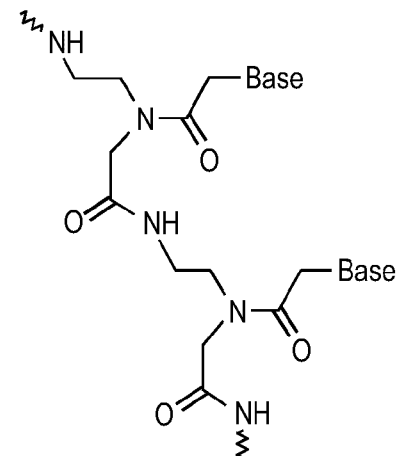
Амид-связанный



Фосфоноацетат

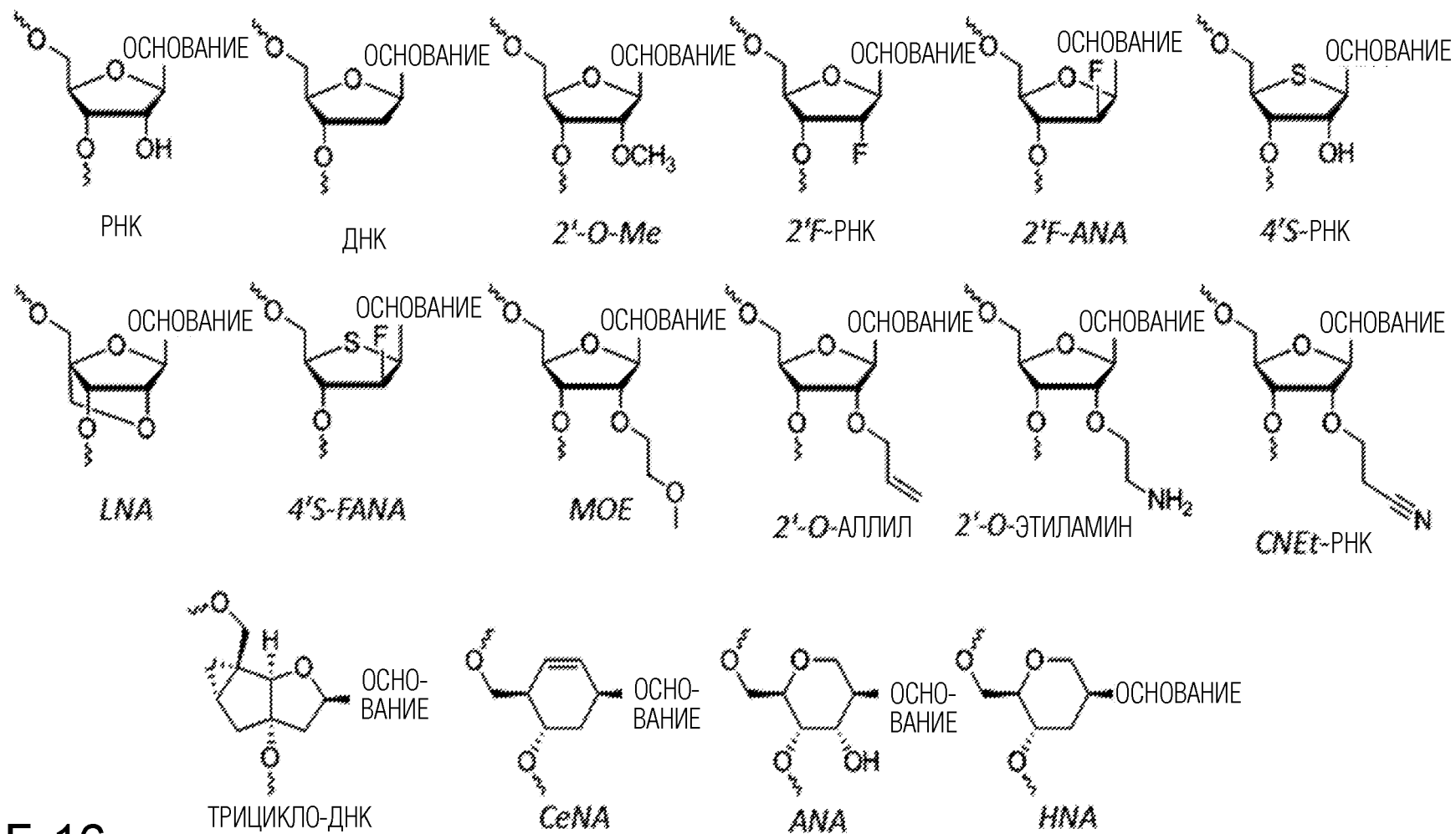


Морфолино



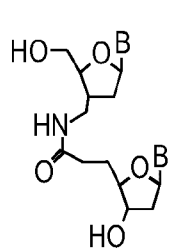
Пептидная нуклеиновая кислота

ФИГ. 15

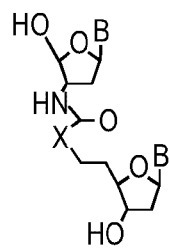


ФИГ. 16

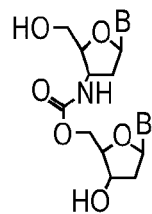
Дизайн не на основе фосфора



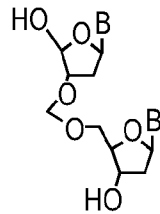
АМИДЫ¹⁰



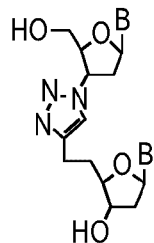
МОЧЕВИНА(X=NH) ИЛИ
КАРБАМАТЫ(X=O)¹¹



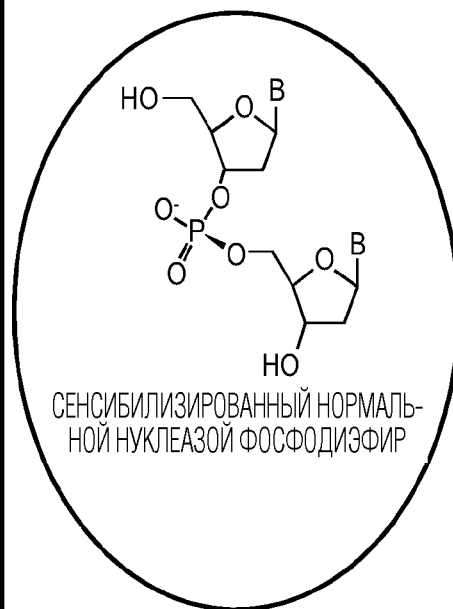
КАРБОНАТЫ¹²



ФОРМАЦЕТАЛИ¹³



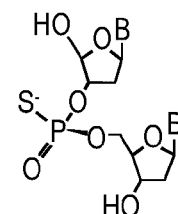
ТРИАЗОЛЫ¹⁴



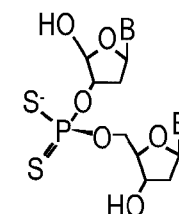
СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫЙ НОРМАЛЬ-
НОЙ НУКЛЕАЗОЙ ФОСФОДИЭФИР

ФИГ. 17

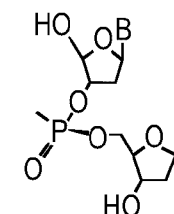
Дизайн на основе фосфора



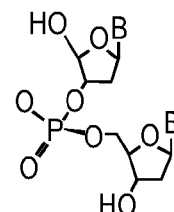
ФОСФОРОТИОАТЫ¹



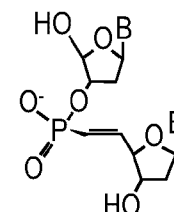
ФОСФОРДИТИОАТЫ²



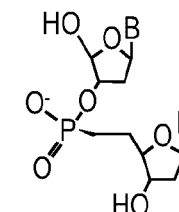
МЕТИЛФОСФОНАТЫ³



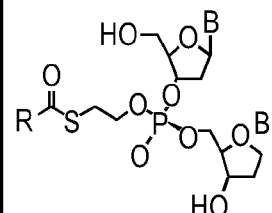
МЕТИЛЕНФОСФОНАТЫ⁴



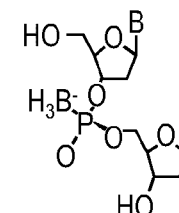
ВИНИЛФОСФОНАТЫ⁵



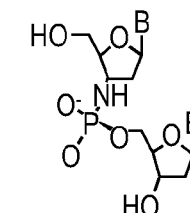
ФОСФОНАТЫ⁶



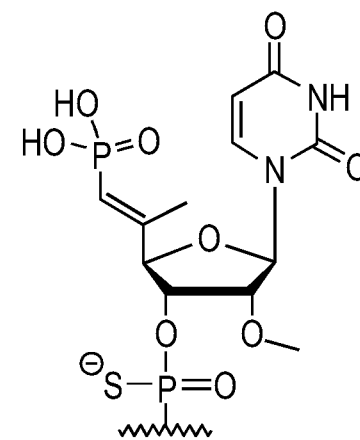
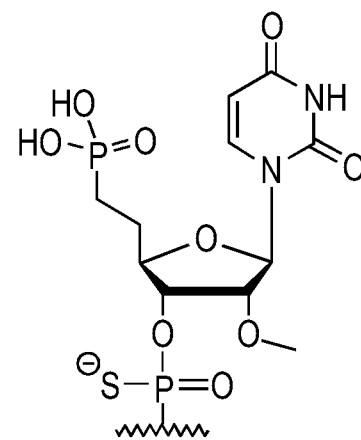
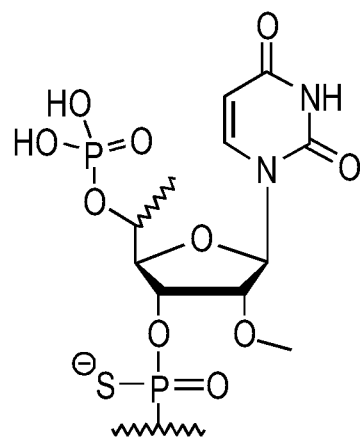
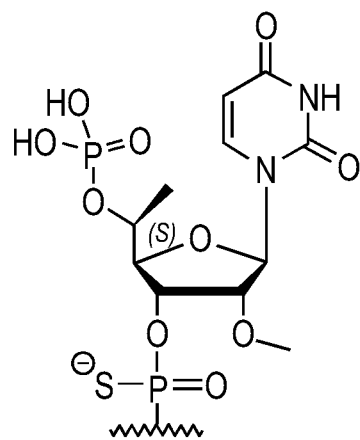
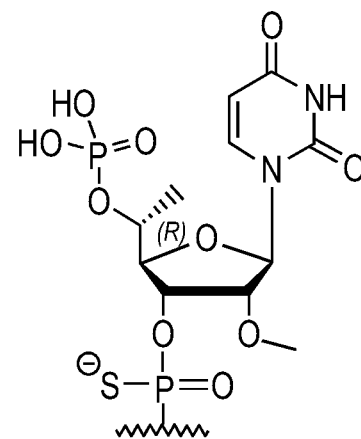
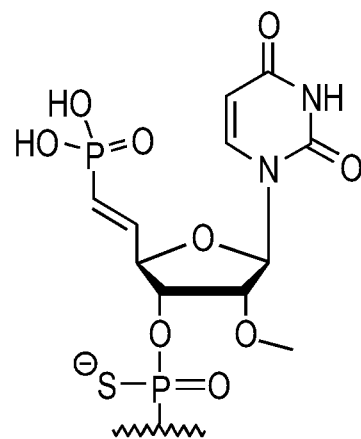
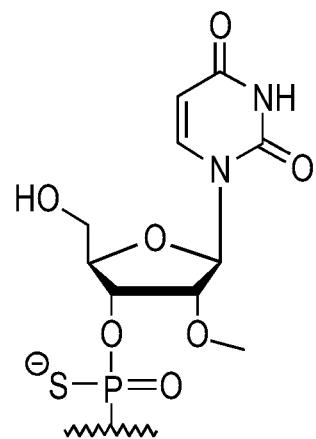
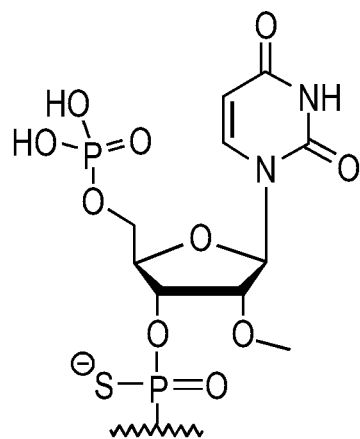
ФОСФОТРИЭФИРЫ⁷



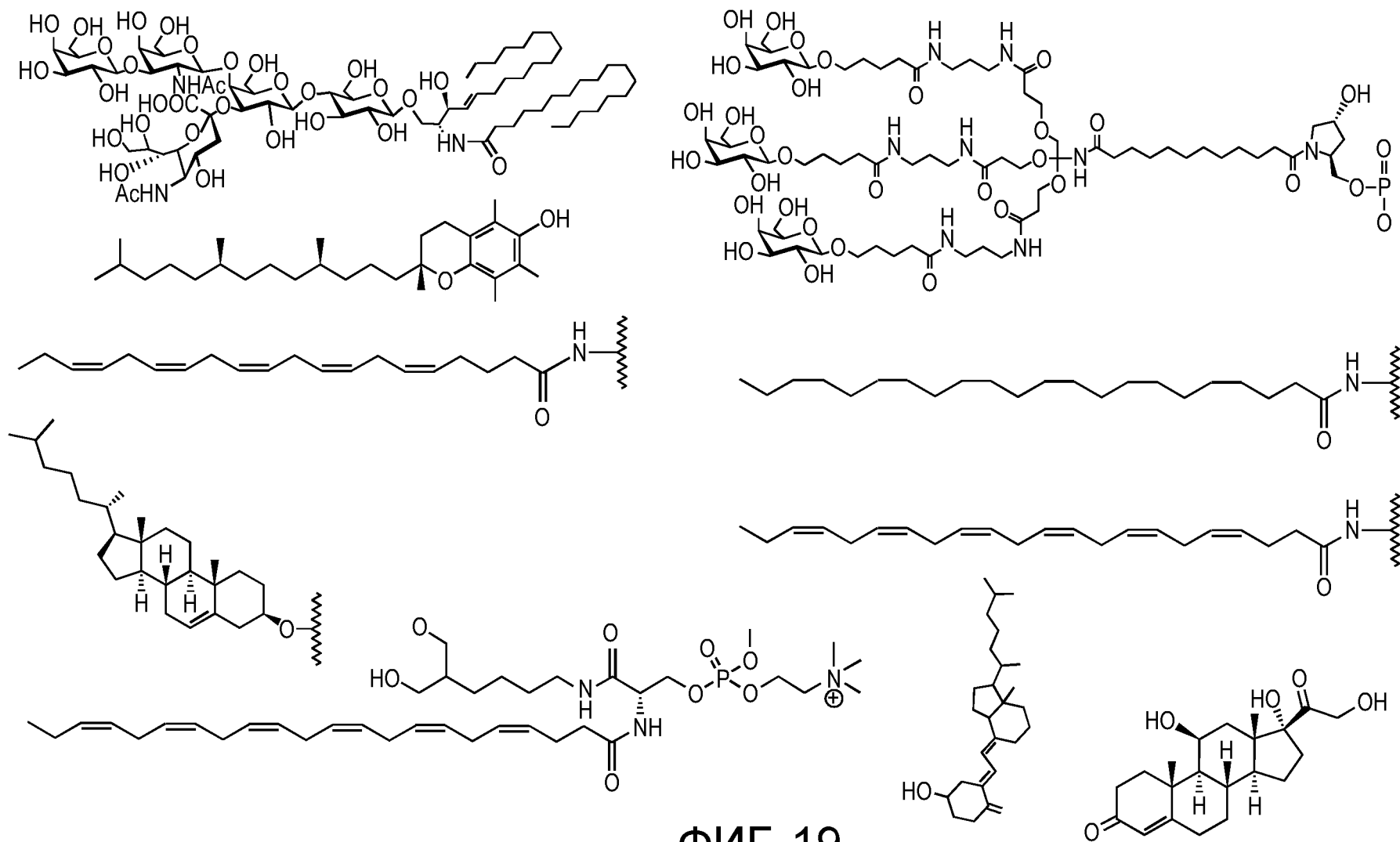
БОРАНОФОСФАТЫ⁸



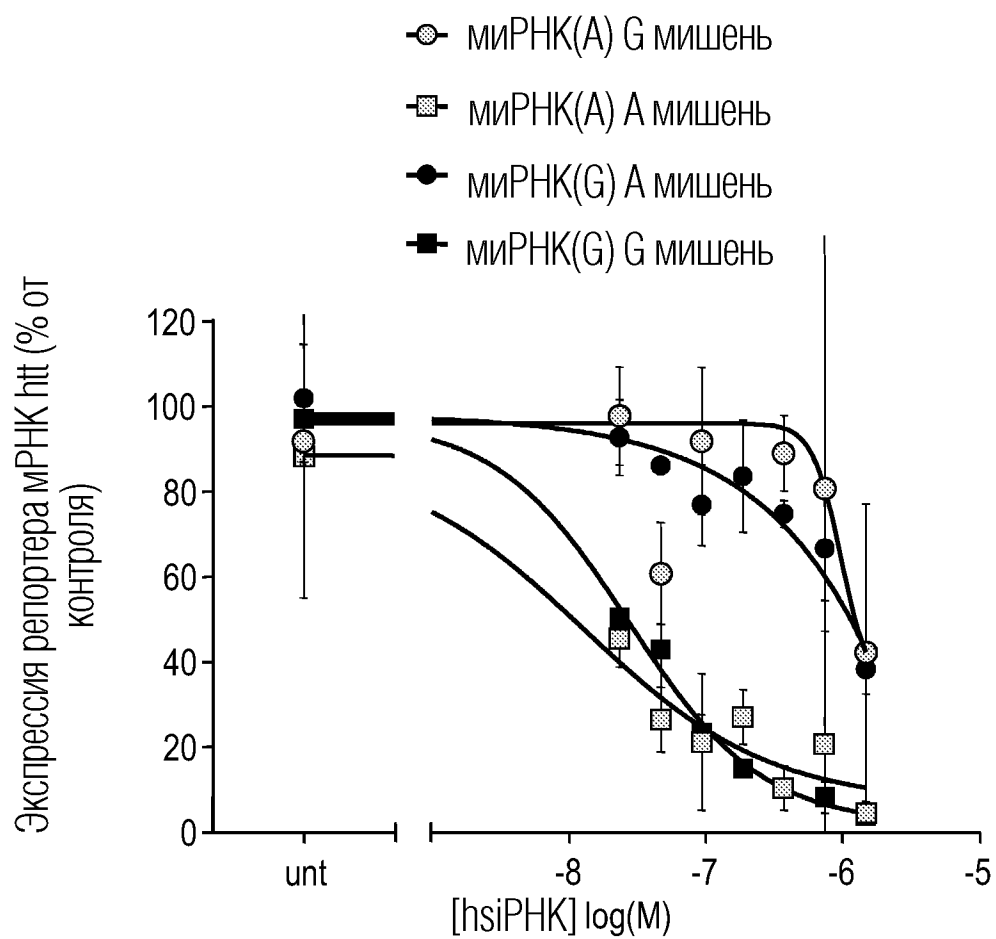
ФОСФОРАМИДАТЫ⁹



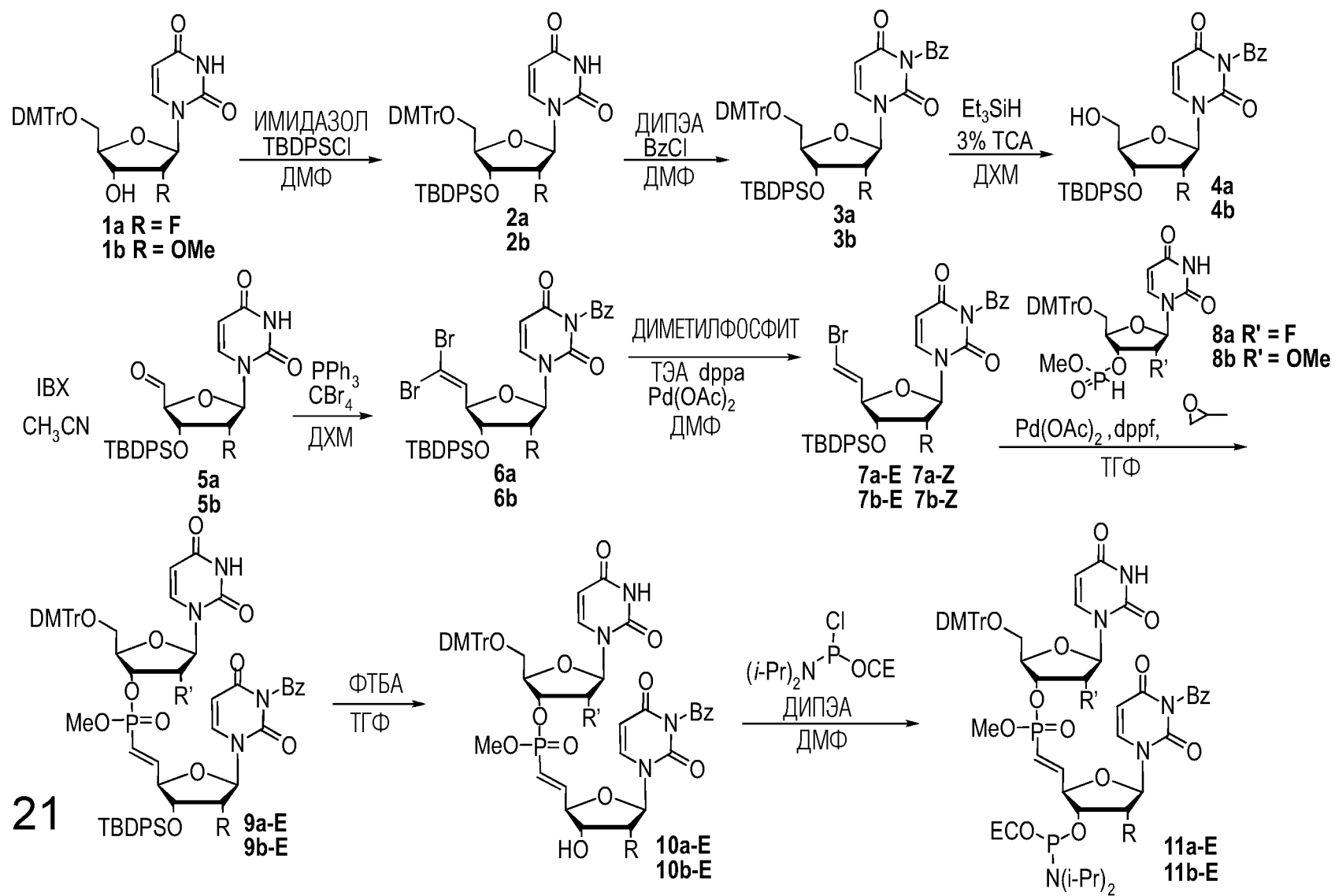
ФИГ. 18



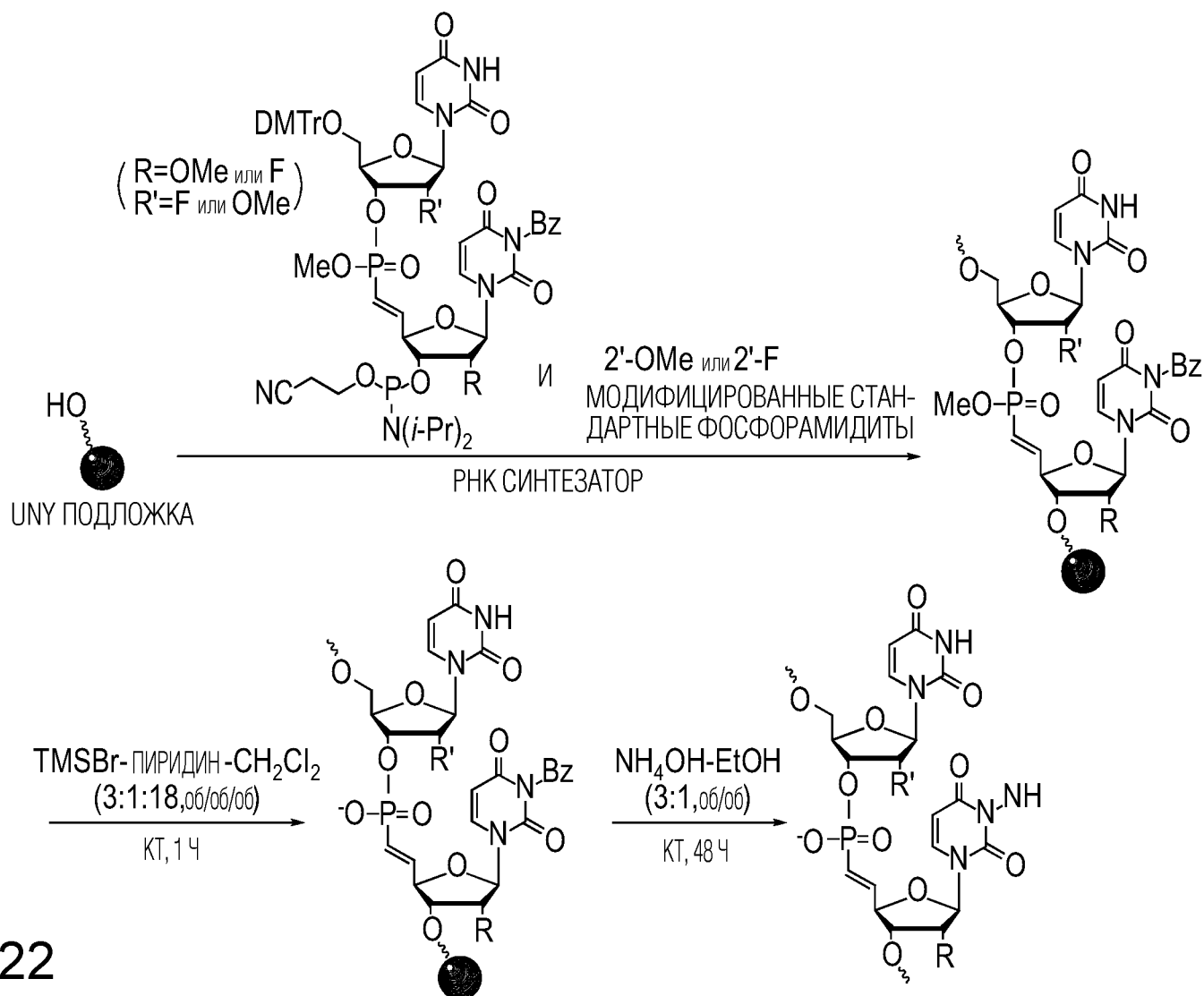
ФИГ. 19



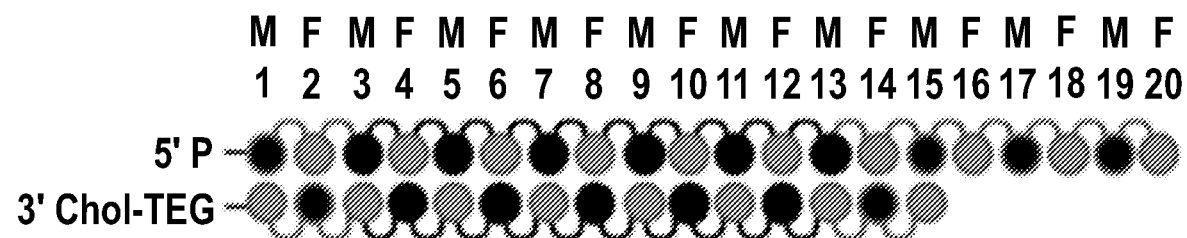
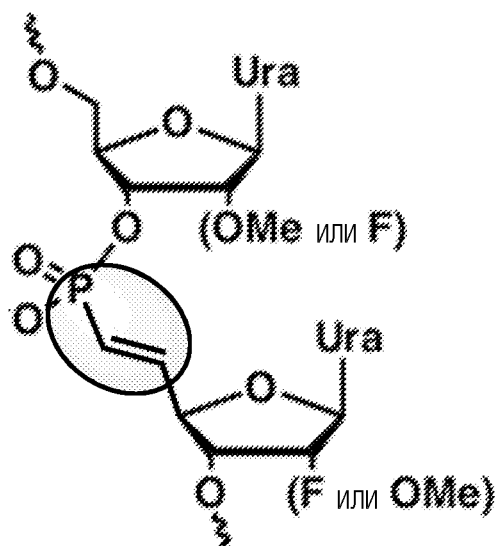
ФИГ. 20



ФИГ. 21

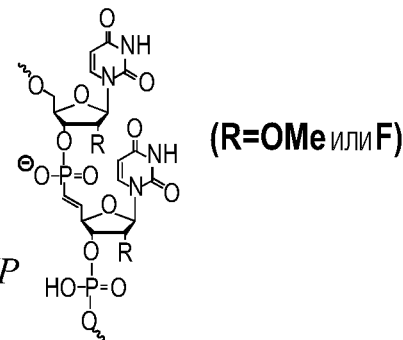


ФИГ. 22

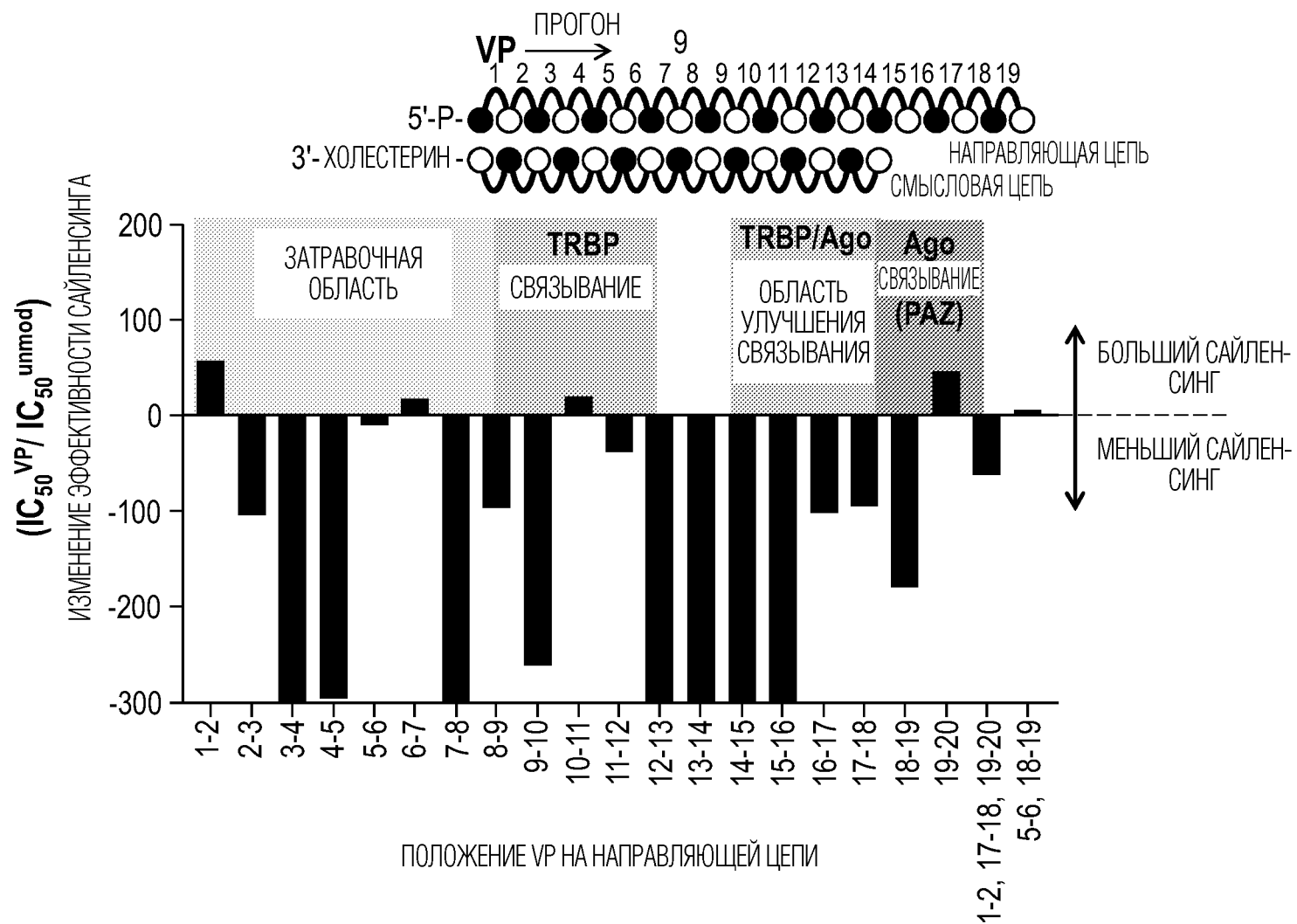


ФИГ. 23

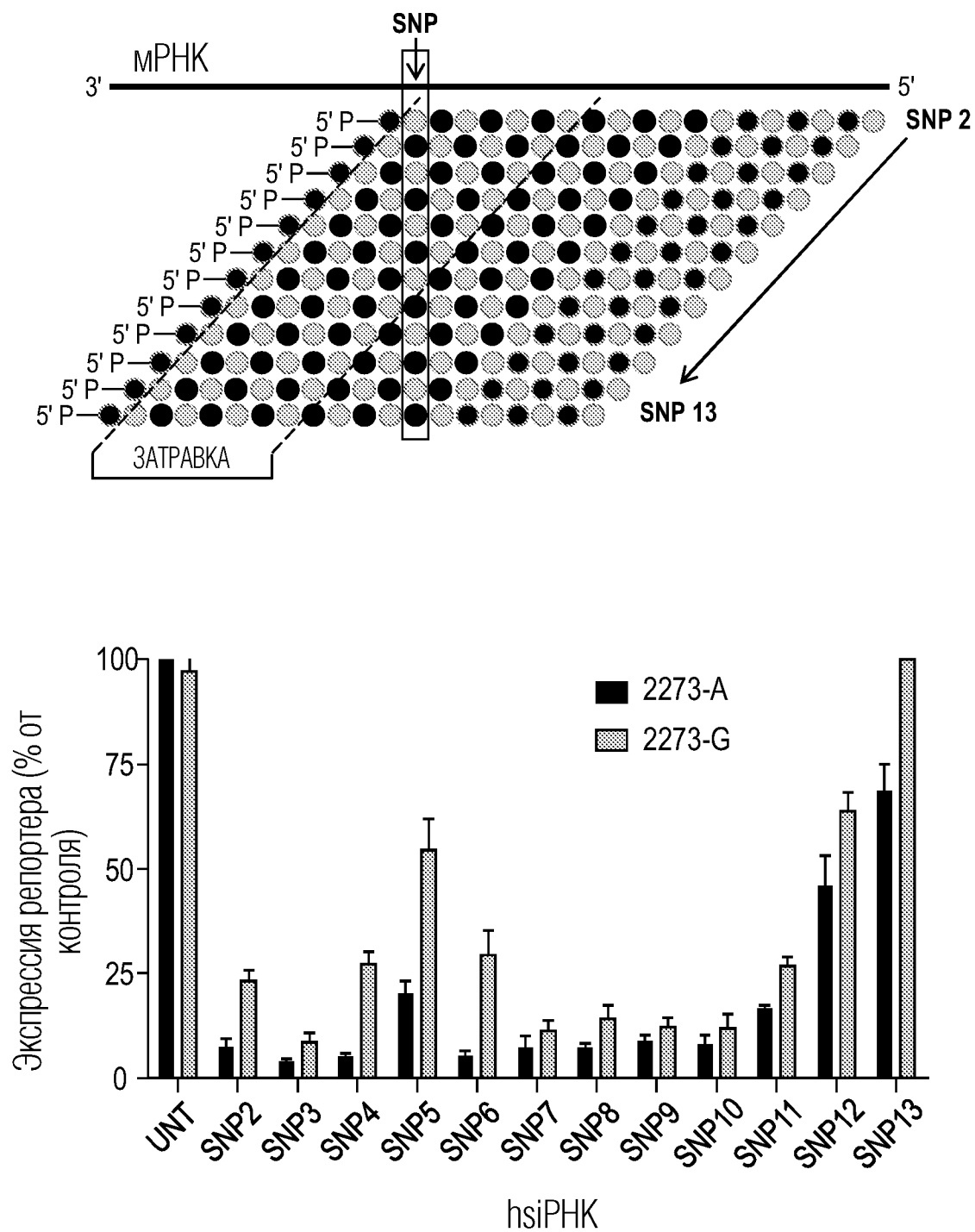
ФИГ. 24



#	НАИМЕНОВАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	РАССЧИТАНО [M-H] ⁻	НАЙДЕНО
2615	HTT10150_1/2	P[mU-fU]#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#(mU)#(fA)#(mU)#(fA)	6599.4	6599.7
2720	HTT_10125_2/3	P(mU)#[fU-mU](fU)(mU)(fA)(mA)(fA)(mU)(fC)(mC)(fU)(mG)#(fA)#(mG)#(fA)#(mA)#(fG)#(mA)#(fA)	6724.5	6724.8
2616	HTT10125_3/4	P(mU)#(fU)#[mU-fU](mU)(fA)(mA)(fA)(mU)(fC)(mC)(fU)(mG)#(fA)#(mG)#(fA)#(mA)#(fG)#(mA)#(fA)	6739.6	6740.7
2721	HTT_10125_4/5	P(mU)#(fU)#(mU)[fU-mU](fA)(mA)(fA)(mU)(fC)(mC)(fU)(mG)#(fA)#(mG)#(fA)#(mA)#(fG)#(mA)#(fA)	6740.6	6740.7
2617	HTT10146_5/6	P(mU)#(fC)#(mU)(fC)[mU-fU](mU)(fA)(mC)(fU)(mG)(fA)(mU)#(fA)#(mU)#(fA)(mA)#(fU)(mU)#(fA)	6614.4	6615.7
2722	HTT_462_6/7	P(mU)#(fA)#(mU)(fC)(mU)[fU-mU](fU)(mC)(fA)(mC)(fA)(mU)#(fA)#(mU)#(fU)#(mG)#(fU)(mC)#(fA)	6631.4	6631.7
2618	HTT8603_7/8	P(mU)#(fG)#(mA)(fA)(mU)(fG)[mU-fU](mC)(fA)(mC)(fG)(mC)(fA)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)#(mG)#(fC)	6801.6	6802.7
2713	HTT_exon1_150-P2-as_s_8/9	P(mU)#(fA)#(mU)(fC)(mA)(fG)(mC)[fU-mU](fU)(mU)(fC)(mC)(fA)#(mG)#(fG)#(mG)#(fU)(mC)#(fG)	6700.5	6700.7
2619	HTT10150_9/10	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)[mU-fU](mU)(fA)(mC)(fU)#(mG)#(fA)(mU)#(fA)#(mU)#(fA)	6615.4	6615.6
2724	HTT_10150_10/11	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)[fU-mU](fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)(mU)#(fA)#(mU)#(fA)	6615.4	6615.6
2620	HTT1219_11/12	p(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mC)(fG)(mU)(fC)(mA)(fG)[mU-fU](mC)#(fA)#(mU)#(fA)#(mA)#(fA)#(mC)#(fC)	6675.5	6675.7
2725	HTT_467_12/13	P(mU)#(fC)#(mC)(fA)(mC)(fU)(mA)(fU)(mG)(fU)(mU)[fU-mU](fC)#(mA)#(fC)#(mA)#(fU)(mA)#(fU)	6590.4	6590.7
2621	HTT1907_13/14	P(mU)#(fC)#(mC)(fA)(mA)(fA)(mU)(fA)(mC)(fU)(mG)(fG)[mU-fU](mG)#(fU)#(mC)#(fG)(mG)#(fU)	6708.5	6708.7
2716	HTT_1257_14/15	P(mU)#(fC)#(mC)(fG)(mG)(fU)(mC)(fA)(mC)(fA)(mA)(fC)(mA)#[fU-mU](fG)#(mU)#(fG)(mG)#(fU)	6707.5	6707.7
2622	HTT462_15/16	P(mU)#(fA)#(mU)(fG)(mU)(fU)(mU)(fU)(mC)(fA)(mC)(fA)(mU)#(fA)#[mU-fU](mG)#(fU)(mC)#(fA)	6615.4	6615.7
2727	HTT_420_16/17	P(mU)#(fU)#(mU)(fG)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fU)(mG)(fA)(mA)#(fA)#(mG)#[fU-mU](fC)#(mU)#(fU)	6710.4	6710.7
2623	HTT10150-mod_17/18	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#[mU-fU](mU)#(fA)	6576.3	6576.7
2728	HTT_10146_18/19	P(mU)#(fC)#(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)(fU)(mG)(fA)(mU)#(fA)#(mU)#(fA)#(mA)#[fU-mU](fA)	6599.4	6599.7
2624	HTT10150-MOD_19/20	P(mU)#(fU)#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)(mU)#(fA)#[mU-fU]	6576.3	6576.7
2625	HTT10150-MOD_1/2_17/18_19/20	P[mU-fU]#(mA)(fA)(mU)(fC)(mU)(fC)(mU)(fU)(mU)(fA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#[mU-fU]#(mU-fU]	6513.2	6513.7

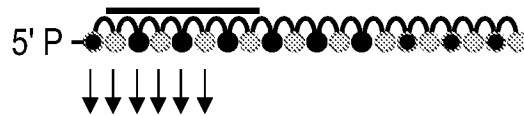


ФИГ. 25



ФИГ. 26

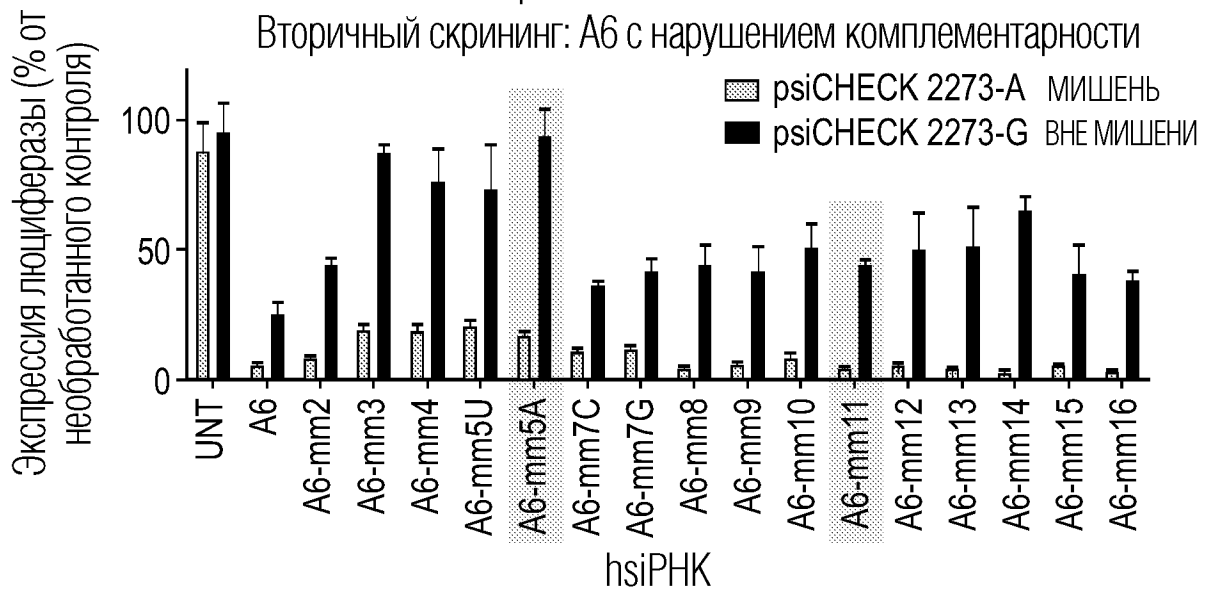
Затравочная область



A6-mm2	5' - U A CUG U AGCAGCAGCUUCUC
A6-mm3	5' - UU U UG U AGCAGCAGCUUCUC
A6-mm4	5' - UUC A G U AGCAGCAGCUUCUC
A6-mm5U	5' - UUCU UU AGCAGCAGCUUCUC
A6-mm5A	5' - UUCU AU AGCAGCAGCUUCUC
A6-mm7C	5' - UUCUG UC GAGCAGCUUCUC
A6-mm7G	5' - UUCUG UG GAGCAGCUUCUC
A6-mm8	5' - UUCUG UAU CAGCAGCUUCUC
A6-mm9	5' - UUCUG UAGU AGCAGCUUCUC
A6-mm10	5' - UUCUG UAGCUG CAGCUUCUC
A6-mm11	5' - UUCUG UAGCAU CAGCUUCUC
A6-mm12	5' - UUCUG UCG CAG U AGCUUCUC
A6-mm13	5' - UUCUG UAGCAGCUG CUUCUC
A6-mm14	5' - UUCUG UAGCAGCAUCU UCUC
A6-mm15	5' - UUCUG UAGCAGCAGUU UCUC
A6-mm16	5' - UUCUG UAGCAGCAGCAUC UCUC

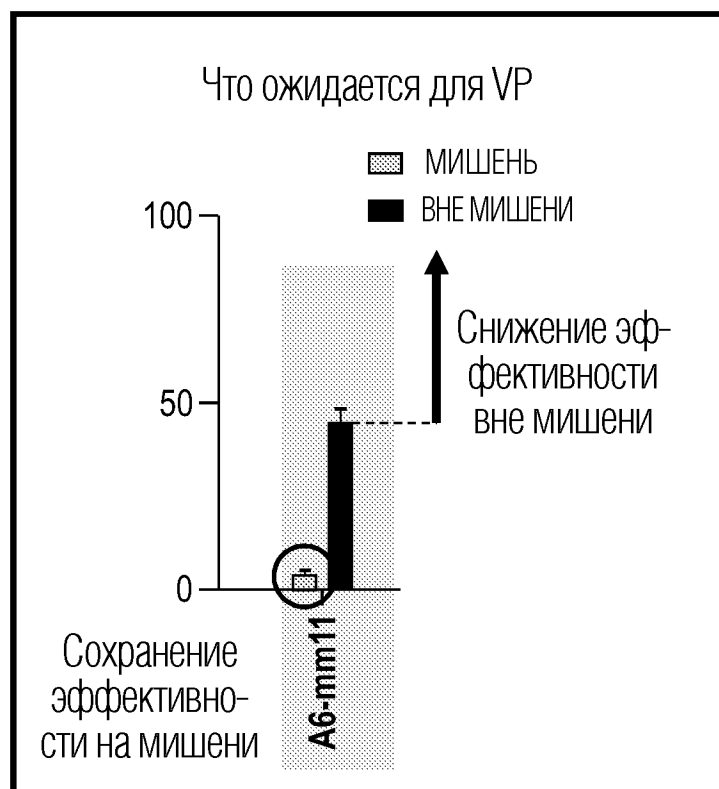
Затравочная область

Вторичный скрининг: A6 с нарушением комплементарности

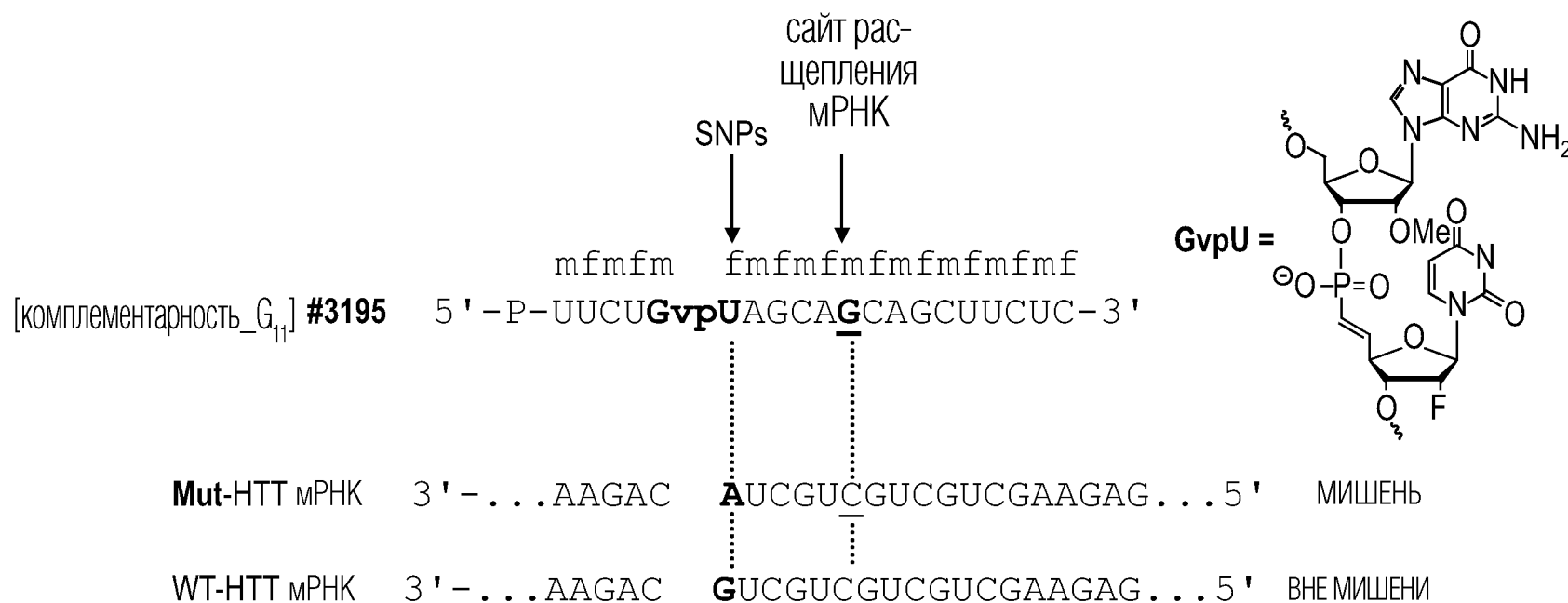


	ВНЕ МИШЕНИ	МИШЕНЬ
A6-mm5A	◎	△
A6-mm11A	△	◎

ФИГ. 27А



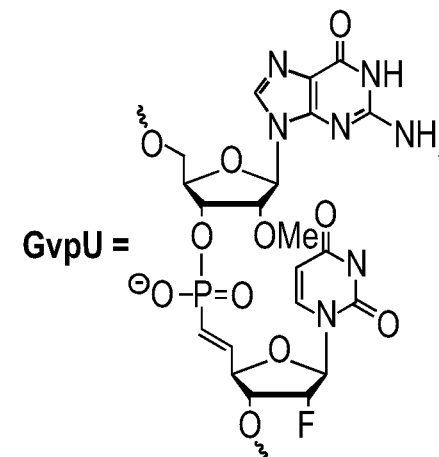
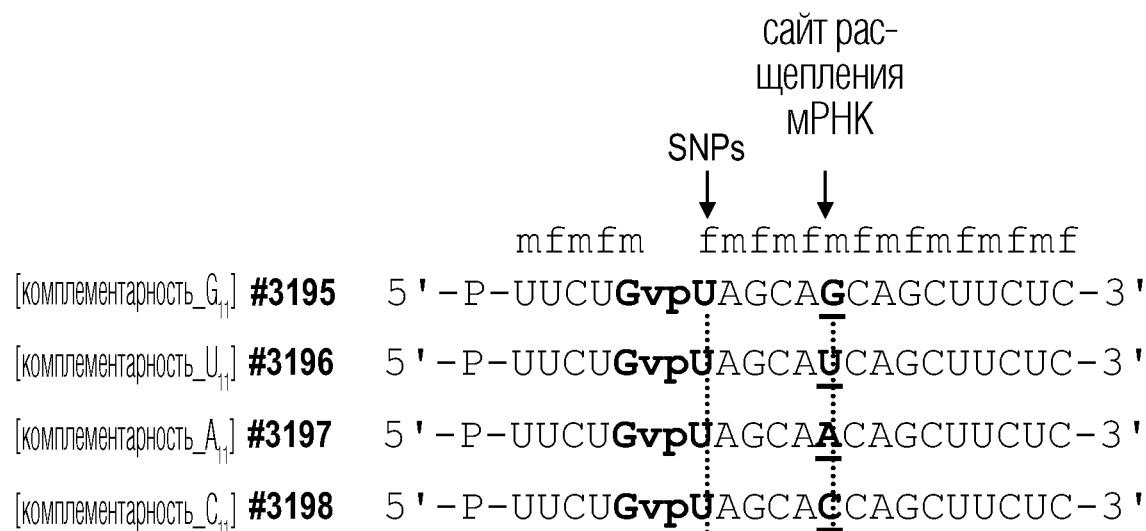
ФИГ. 27В



3195	KEN	HTT_SNP	vpGU	комплементарность G	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3196	KEN	HTT_SNP	vpGU	нарушение комплементарности U	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3197	KEN	HTT_SNP	vpGU	нарушение комплементарности A	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mA)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3198	KEN	HTT_SNP	vpGU	нарушение комплементарности C	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mC)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)

P : ФОСФАТ , # : ФОСФОРОТИОАТ , (mN) : 2'-ОМе, (fN) : 2'-F, [mG-fU] : E-VP-СВЯЗАННЫЙ mG/fU ДИМЕР

ФИГ. 28А



Mut-HTT мРНК 3' - ...AAGAC **A**UCGU**C**GUCGUCGAAGAG...5' **МИШЕНЬ**

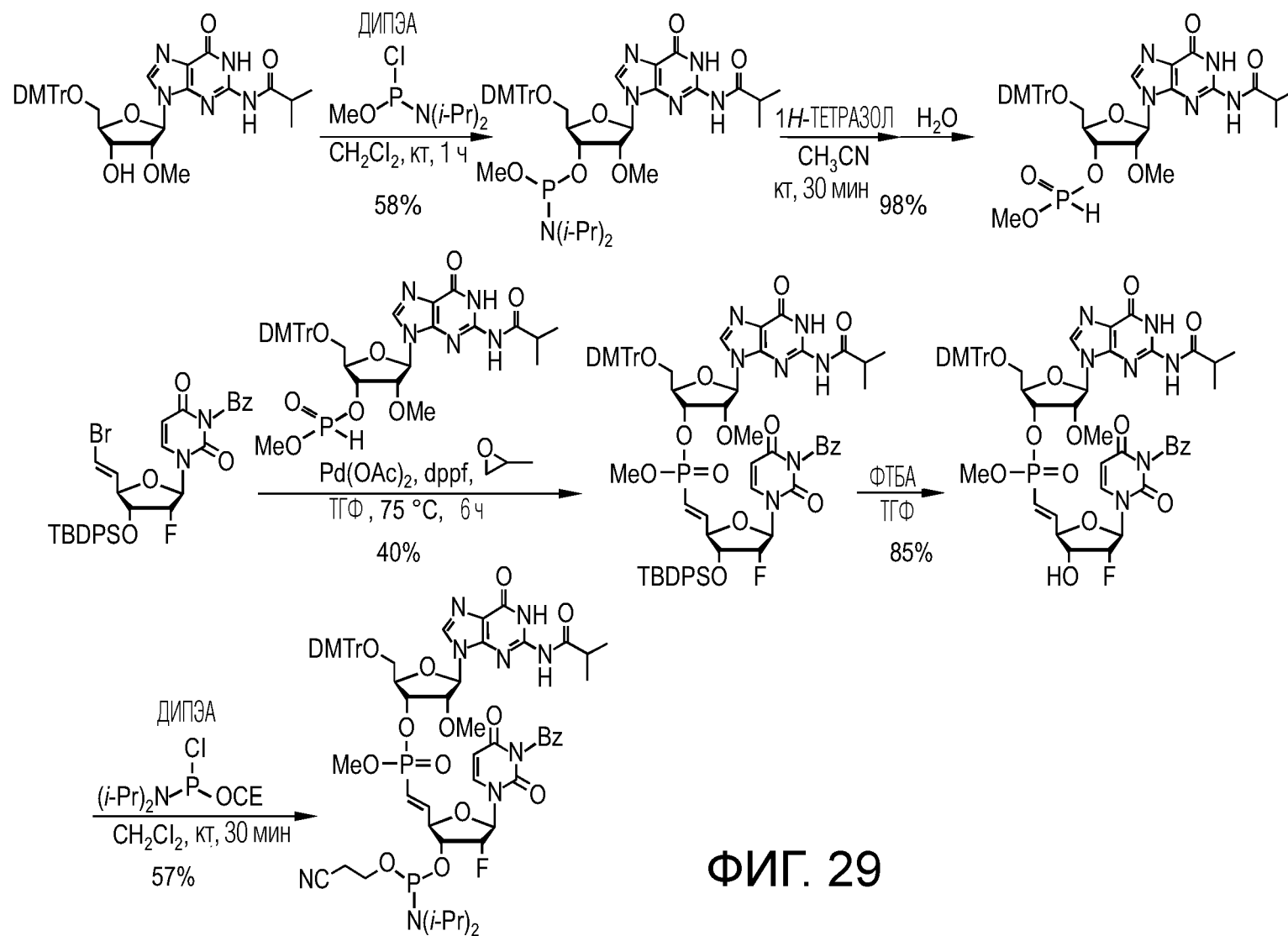
WT-HTT мРНК 3' - ...AAGAC **G**UCGU**C**GUCGUCGAAGAG...5' **ВНЕ МИШЕНИ**

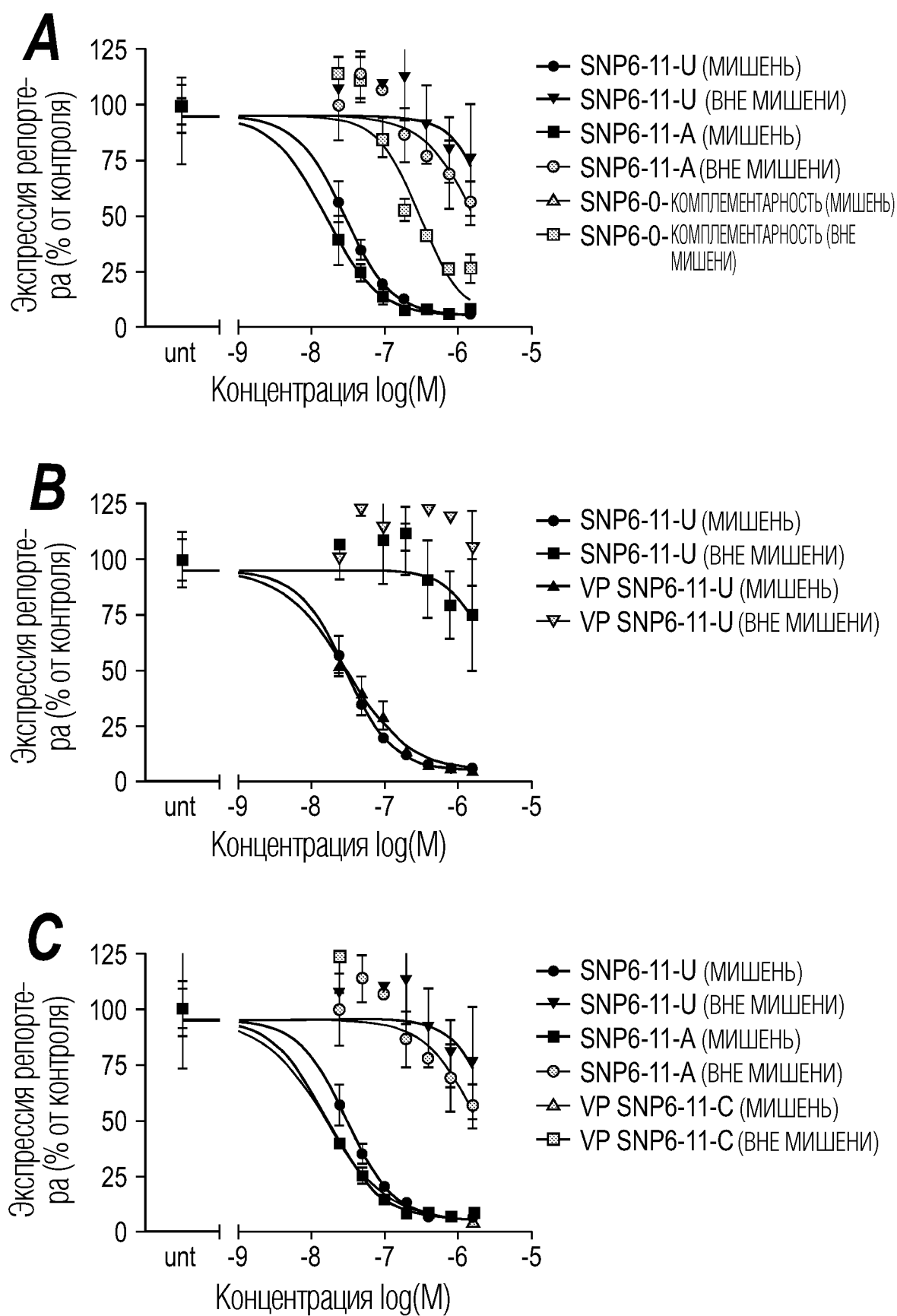
Последовательность, введенная в синтезатор

3195	KEN	HTT_SNPс_vpGU_комплементарность G	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3196	KEN	HTT_SNPс_vpGU_нарушение комплементарностиU	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mU)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3197	KEN	HTT_SNPс_vpGU_нарушение комплементарностиA	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mA)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
3198	KEN	HTT_SNPс_vpGU_нарушение комплементарностиC	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG-fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mC)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)

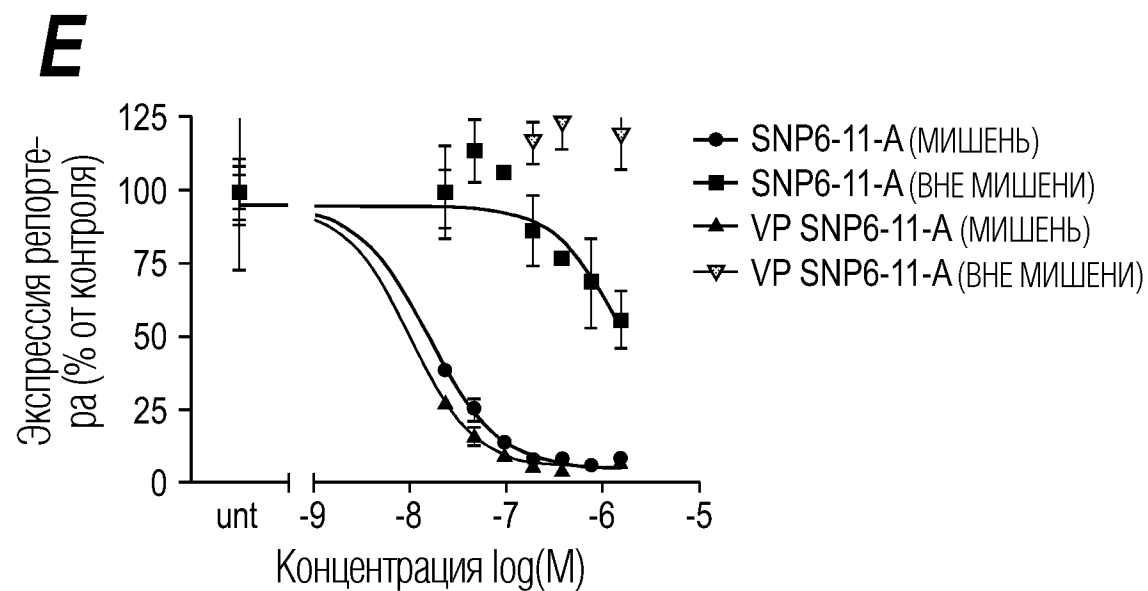
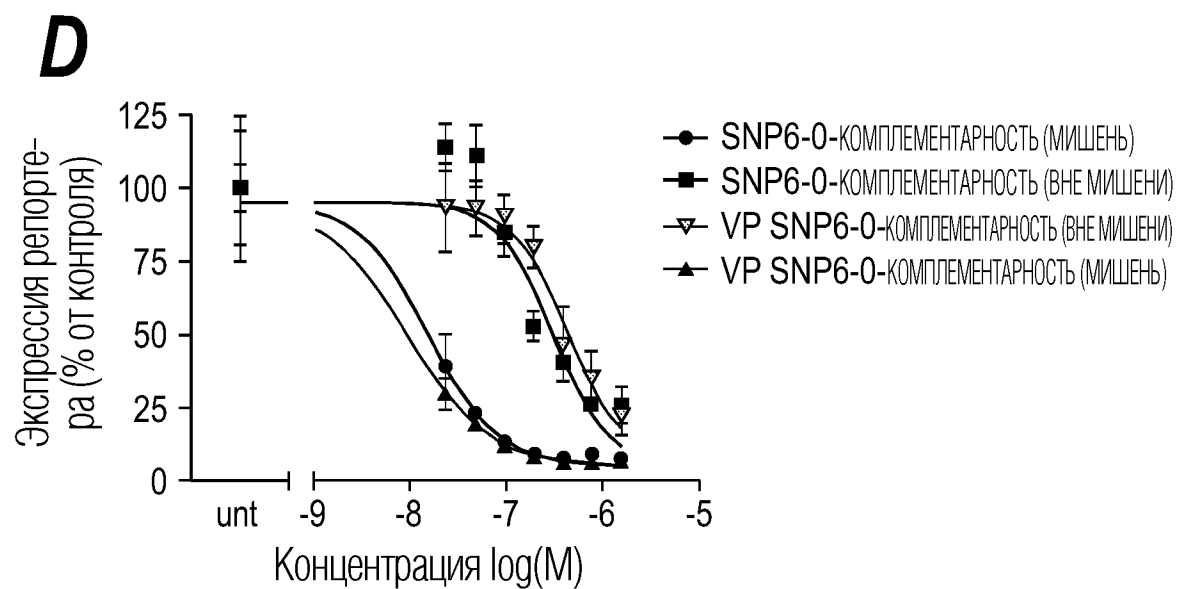
P : ФОСФАТ , #: ФОСФОРОТИОАТ , (mN): 2'-OMe, (fN): 2'-F, [mG-fU]: E-VP-СВЯЗАННЫЙ mG/fU ДИМЕР

ФИГ. 28В

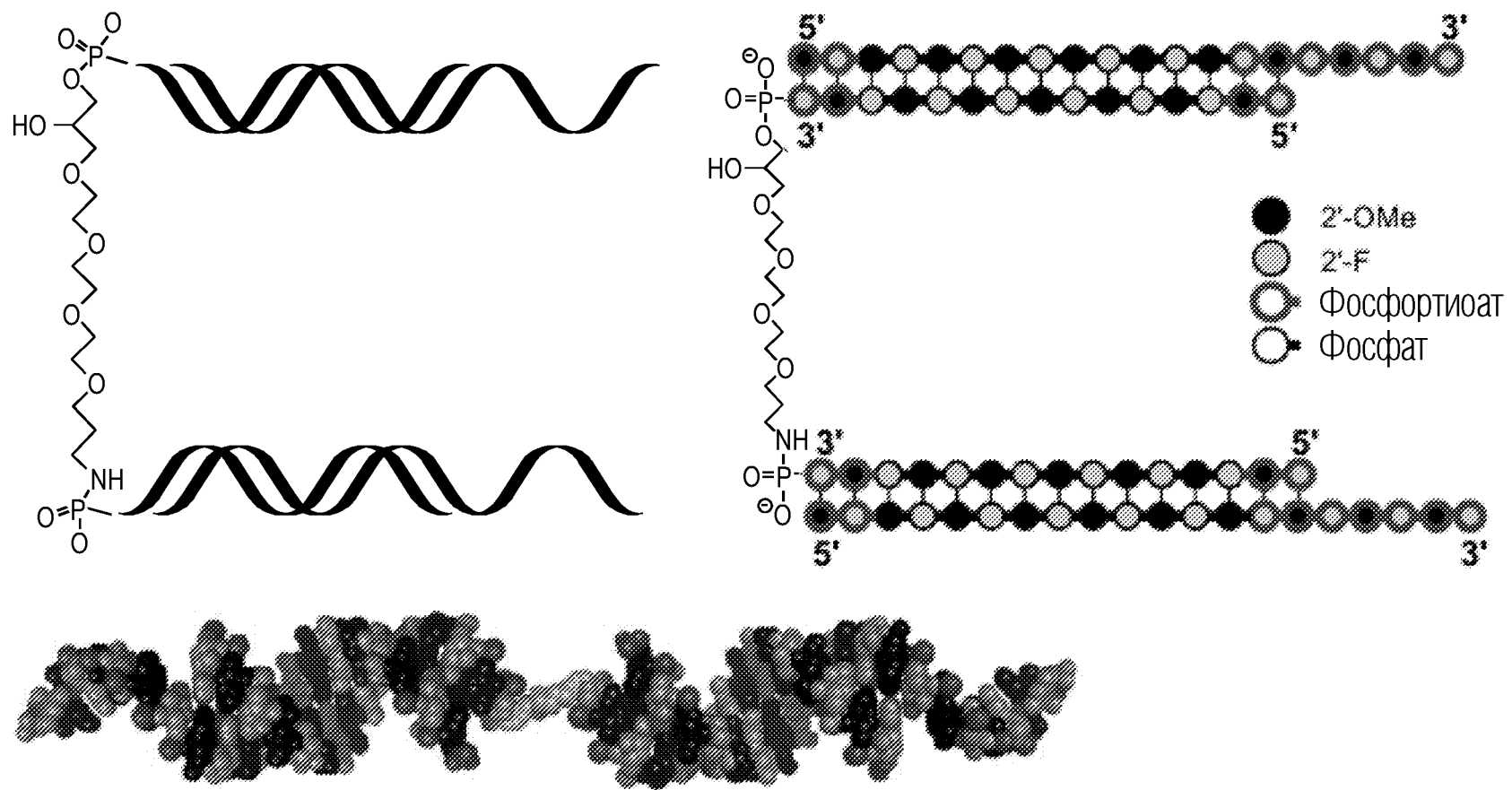




ФИГ. 30

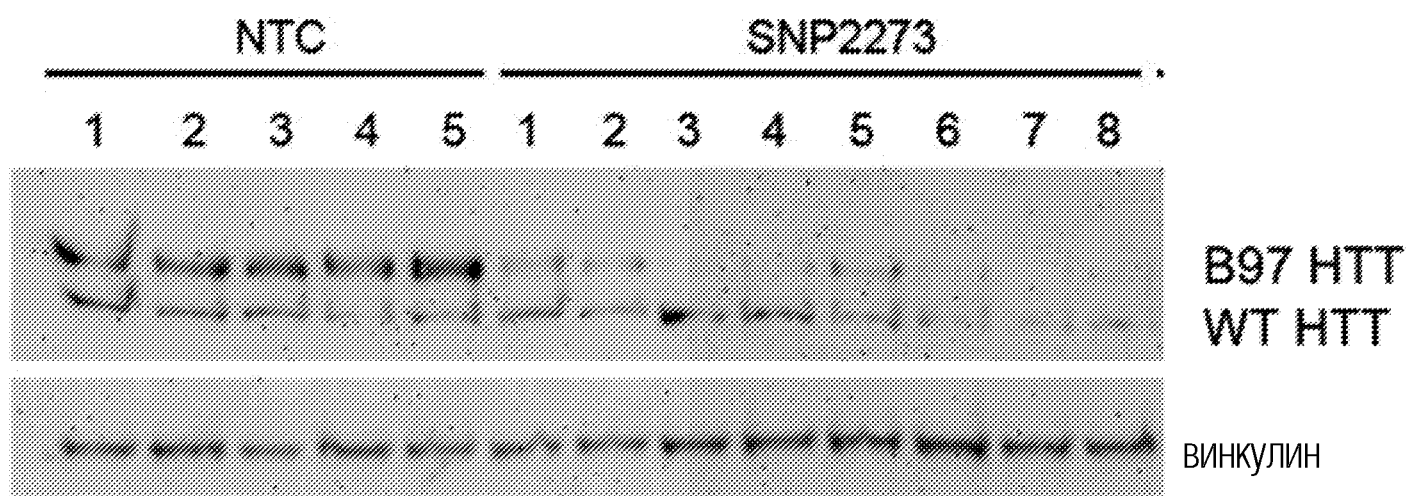


ФИГ. 30



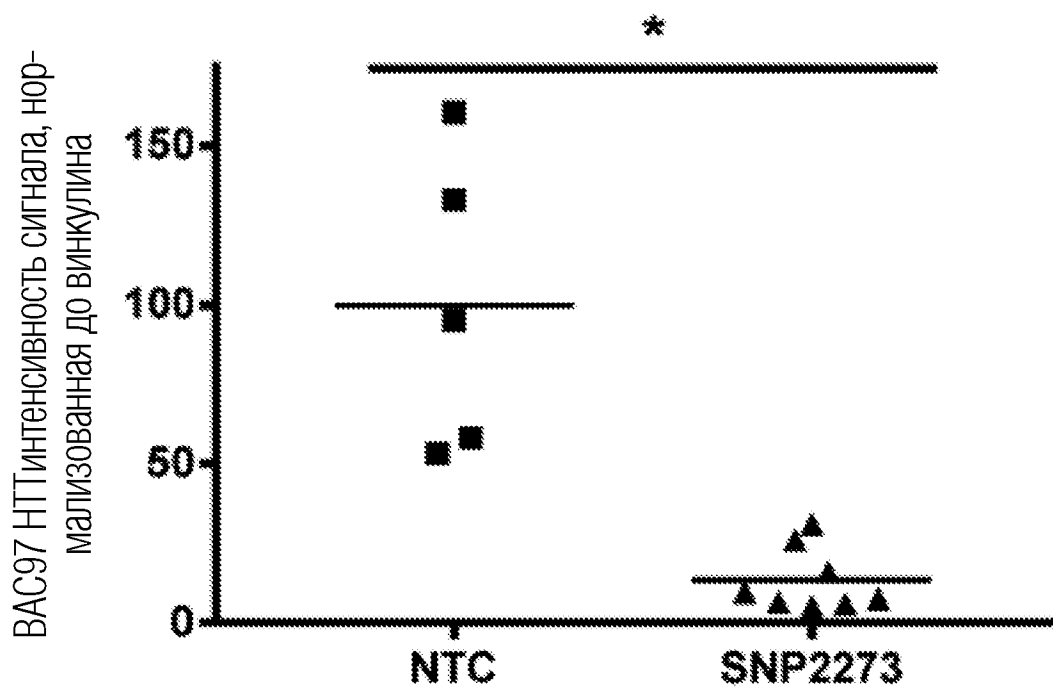
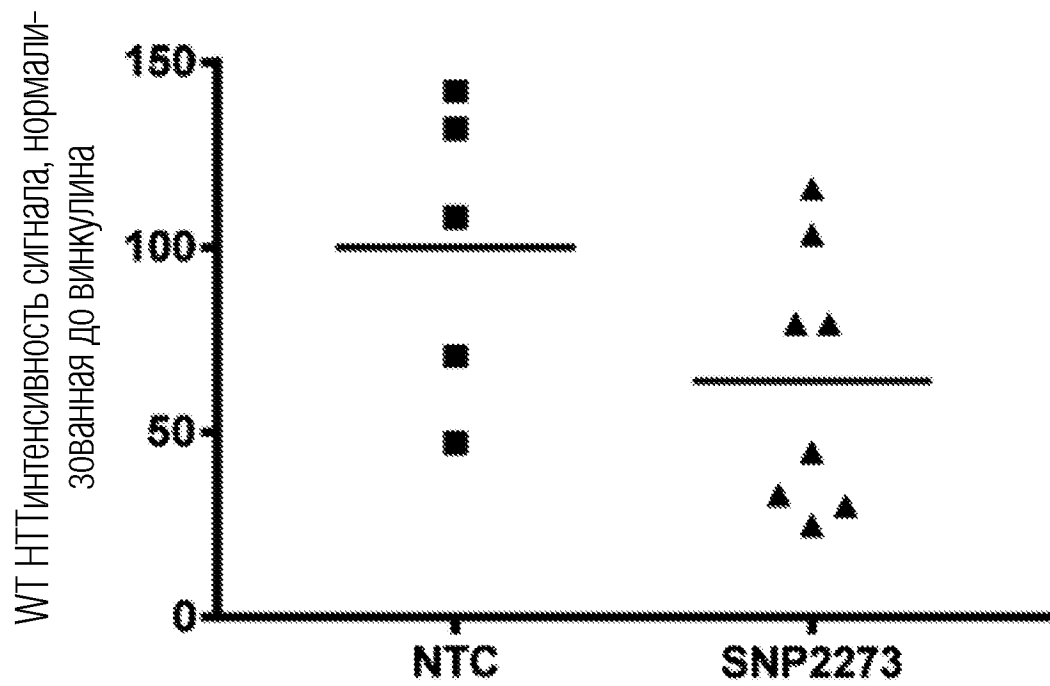
ФИГ. 31

BAC97 полосатое тело

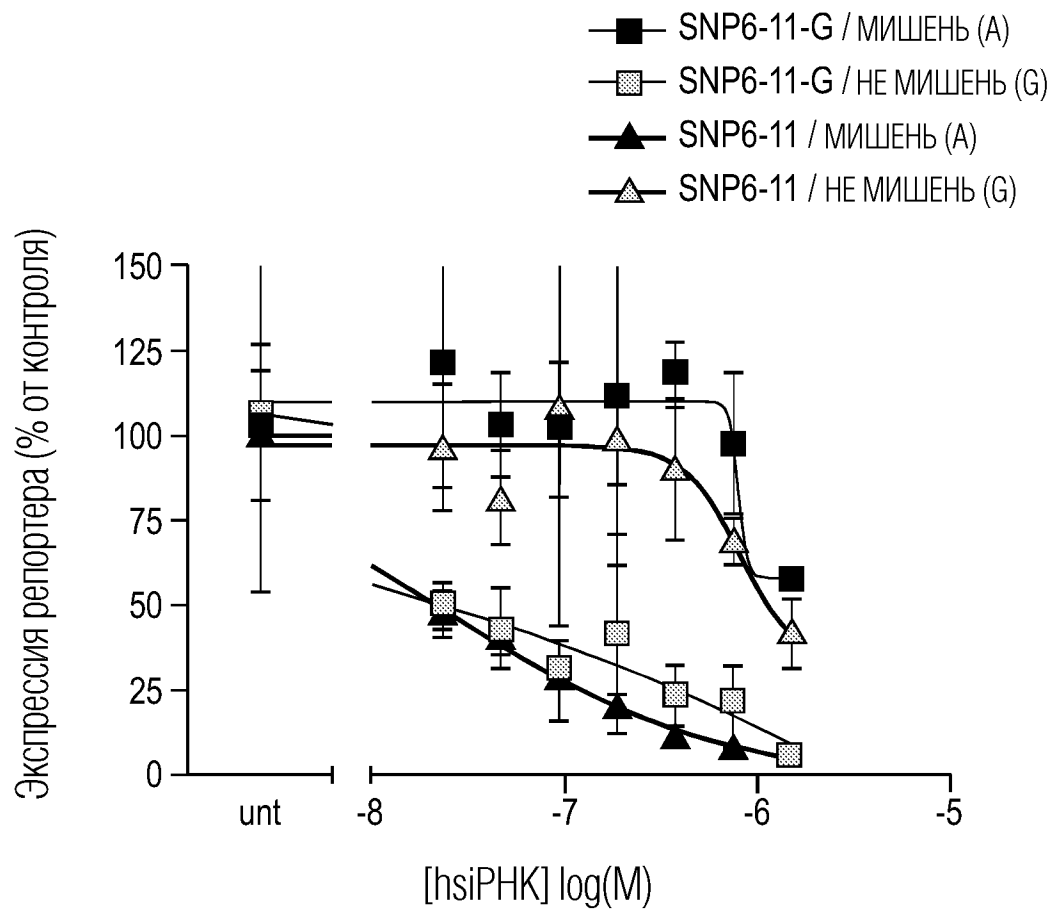


37/57

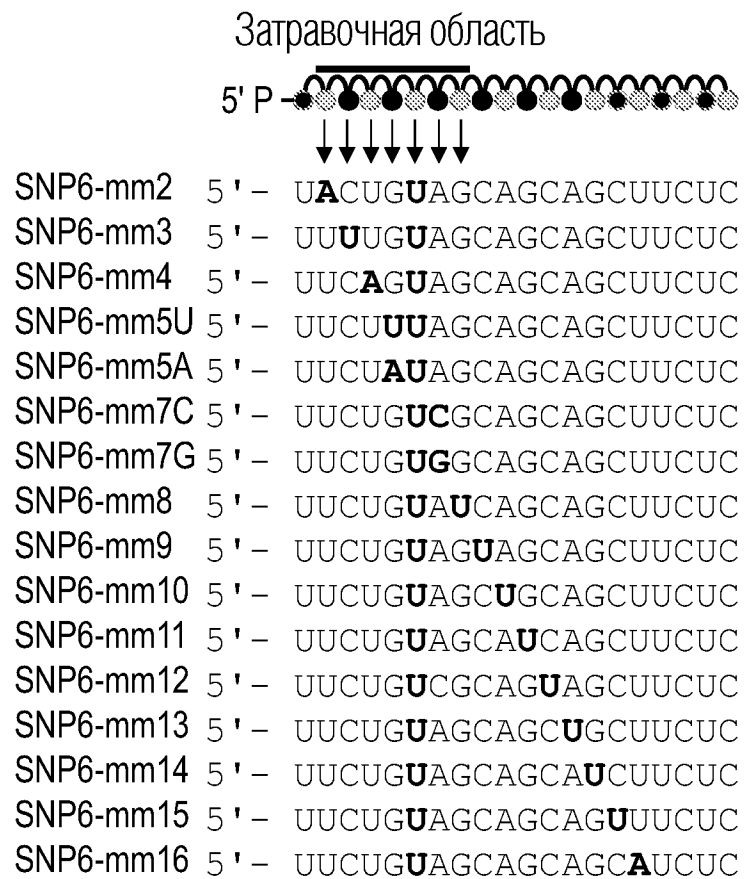
ФИГ. 32А



ФИГ. 32В

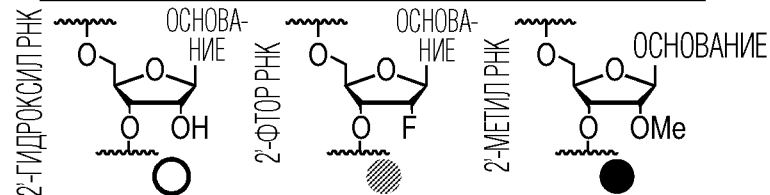
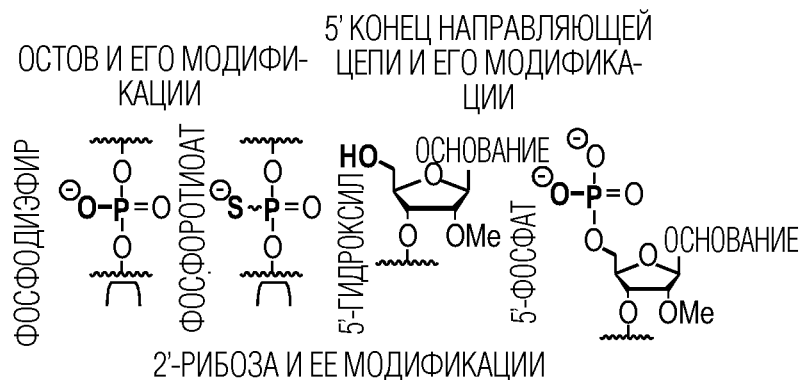


ФИГ. 33



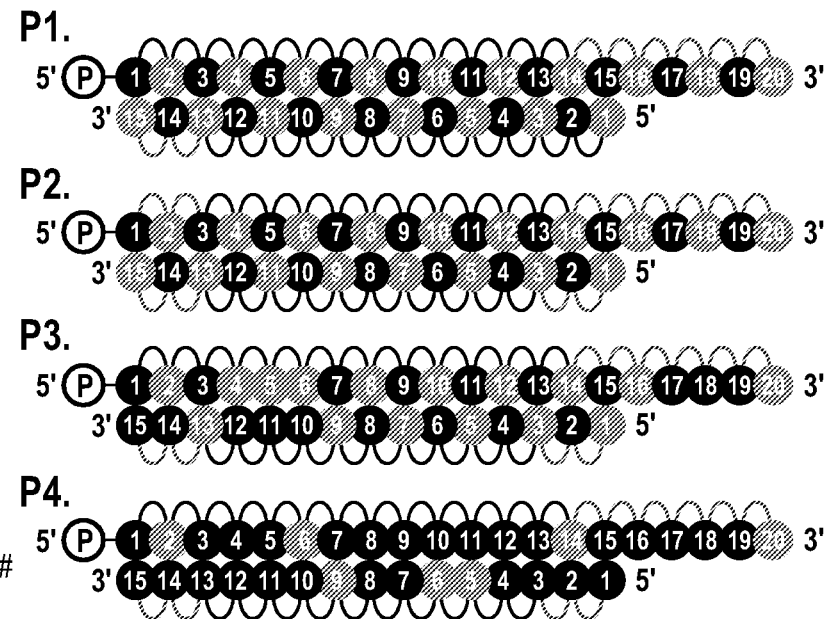
Затравочная область

ФИГ. 34

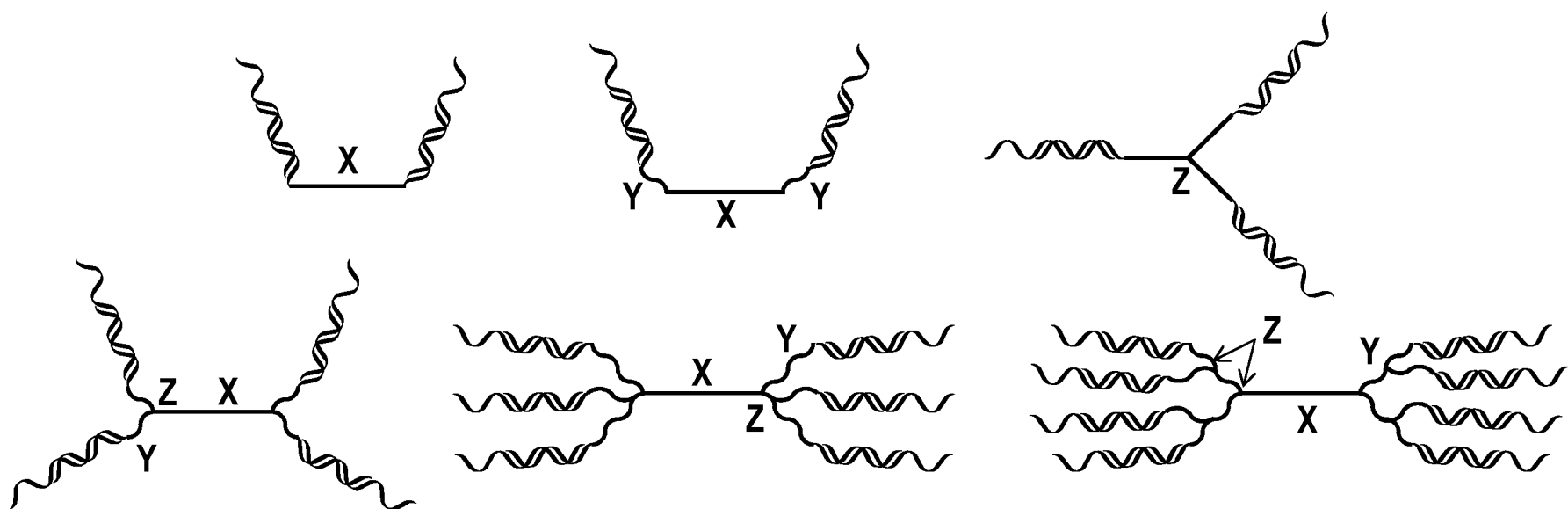


P5. V(mU)#(fU)#(mA)(mA)(mU)(fC)(mU)(mC)(mU)(mU)(mU)(mA)(mC)#(fU)#(mG)#(fA)#(mU)#(mA)#(mU)#(fA)(mC)#(mA)#(mG)(mU)(fA)(fA)(fA)(mG)(fA)(mG)(mA)(mU)(mU)#(mA)#(mA)-DIO

ПАТТЕРН	AS	СМЫСЛОВАЯ	ПРИМЕЧАНИЯ
P1	mf ПАТТЕРН, 6PS НА 3'	fm ПАТТЕРН, 2PS НА 3'	5'P(mU) P(mU)(fU)(mU)(fU)(mG)(fG)(mA)(fU)(mA)(fA)(mA)(fC)(mU)(fG)#(mG)#(fU)#(mA)#(fG)#(mC)#(fC) (fC)(mC)(fA)(mG)(fU)(mU)(fU)(mA)(fU)(mC)(fC)(mA)(fA)#(mA)#(fA)-TegChol
P2	mf ПАТТЕРН, 2PS НА 5' И 7PS НА 3'	fm ПАТТЕРН, 2PS НА 5 И 3'	5'P(mU) P(mU)#(fU)#(mU)(fU)(mG)(fG)(mA)(fU)(mA)(fA)(mA)(fC)(mU)#(fG)#(mG)#(fU)#(mA)#(fG)#(mC)#(fC) (fC)#(mC)#(fA)(mG)(fU)(mU)(fU)(mA)(fU)(mC)(fC)(mA)(fA)#(mA)#(fA)-TegChol
P3	P2 C (f5, m18)	P2 C (m1, m11, m15)	5'P(mU) P(mU)#(fU)#(mU)(fU)(fG)(fG)(mA)(fU)(mA)(fA)(mA)(fC)(mU)#(fG)#(mG)#(fU)#(mA)#(mG)#(mC)#(fC) (mC)#(mC)#(fA)(mG)(fU)(mU)(fU)(mA)(fU)(mC)(mC)(mA)(fA)#(mA)#(mA)-TegChol
P4 (БОГАТАЯ МЕТИЛОМ)	P2 C (f2, f6, f14, f20)	ВСЕ МЕТИЛЫ, ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ f5, f6, f9 И P2 PS ПАТТЕРН	5'P(mU) P(mU)#(fU)#(mU)(mU)(mG)(fG)(mA)(mU)(mA)(mA)(mA)(mC)(mU)#(fG)#(mG)#(mU)#(mA)#(mG)#(mC)#(fC) (mC)#(mC)#(mA)(mG)(fU)(fU)(mU)(mA)(fU)(mC)(mC)(mA)(mA)#(mA)#(mA)-TegChol



ФИГ. 35

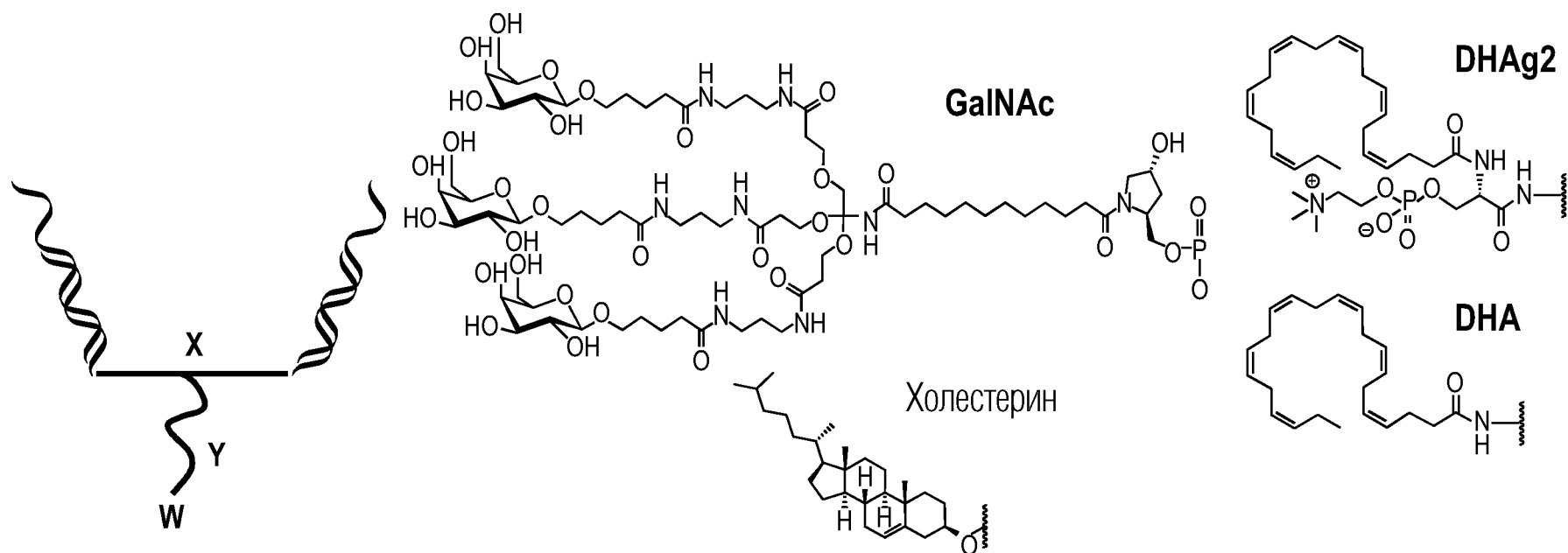


Где X является алкилом: $(C)_n$ или полиэфиром: $(CH_2OCH_2)_n$ полиэтиленом: $(CH_2CH_2O)_n$ и т.д. Или любым блоксополимером, пептидом или полипептидом, или любой их смесью.

Где Y является спейсером или разделителем, расщепляемым или нет. Композиции аналогичны указанным выше.

Где Z является группой точки ветвления.

ФИГ. 36



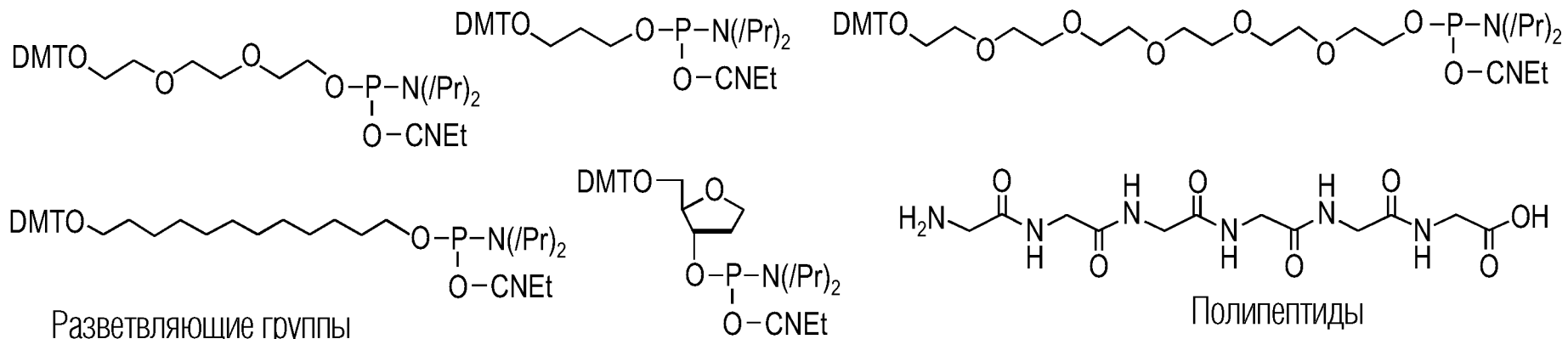
Где X является $(\text{C})_n$ или полиэфиром: $(\text{CO})_n$ полиэтиленом: $(\text{COC})_n$ или (CONH) или их смесью.

Где Y является $(\text{C})_n$ или полиэфиром: $(\text{CO})_n$ полиэтиленом: $(\text{COC})_n$ или (CONH) или их смесью или спейсером или разделителем, расщепляемым или нет.

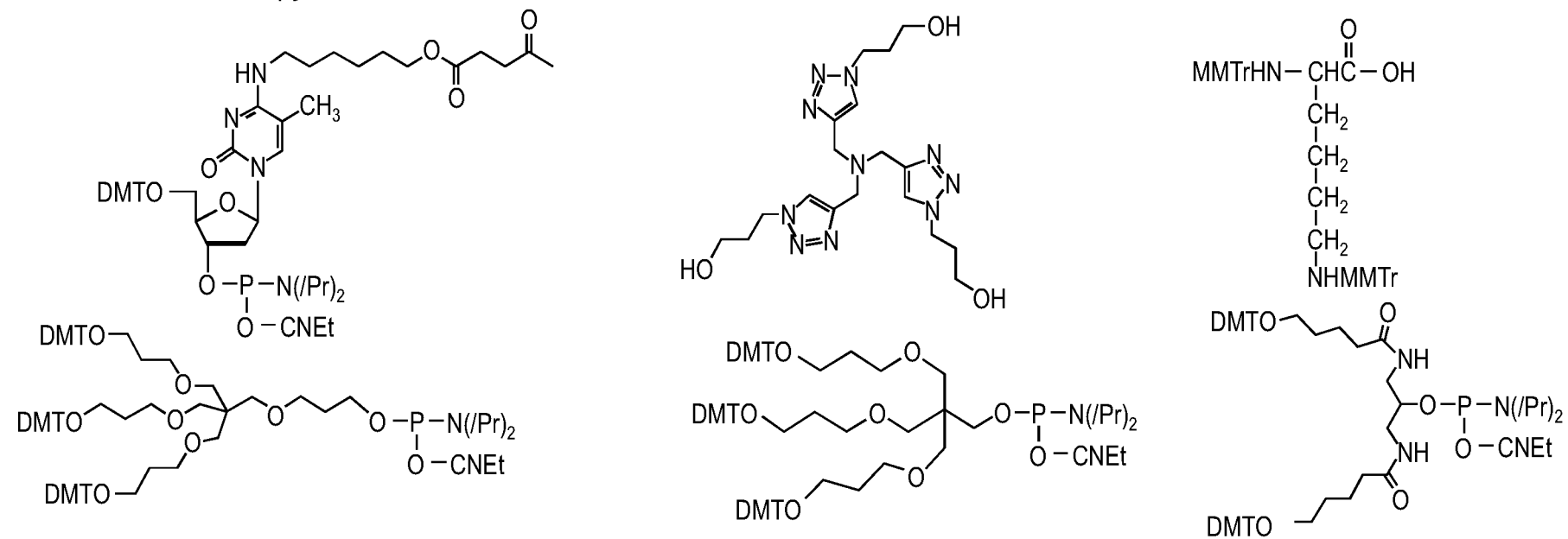
Где W является биоактивным конъюгатом (правым).

ФИГ. 37

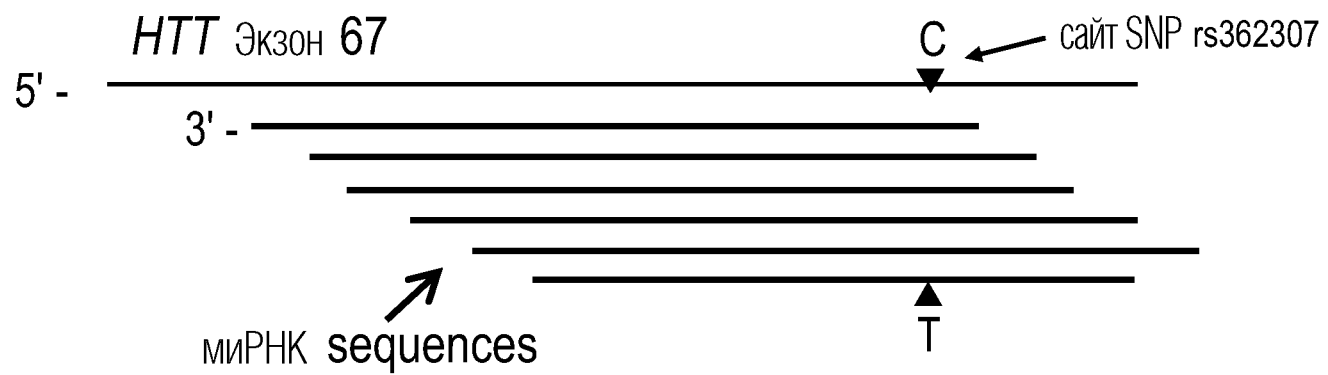
Линкеры и спейсеры



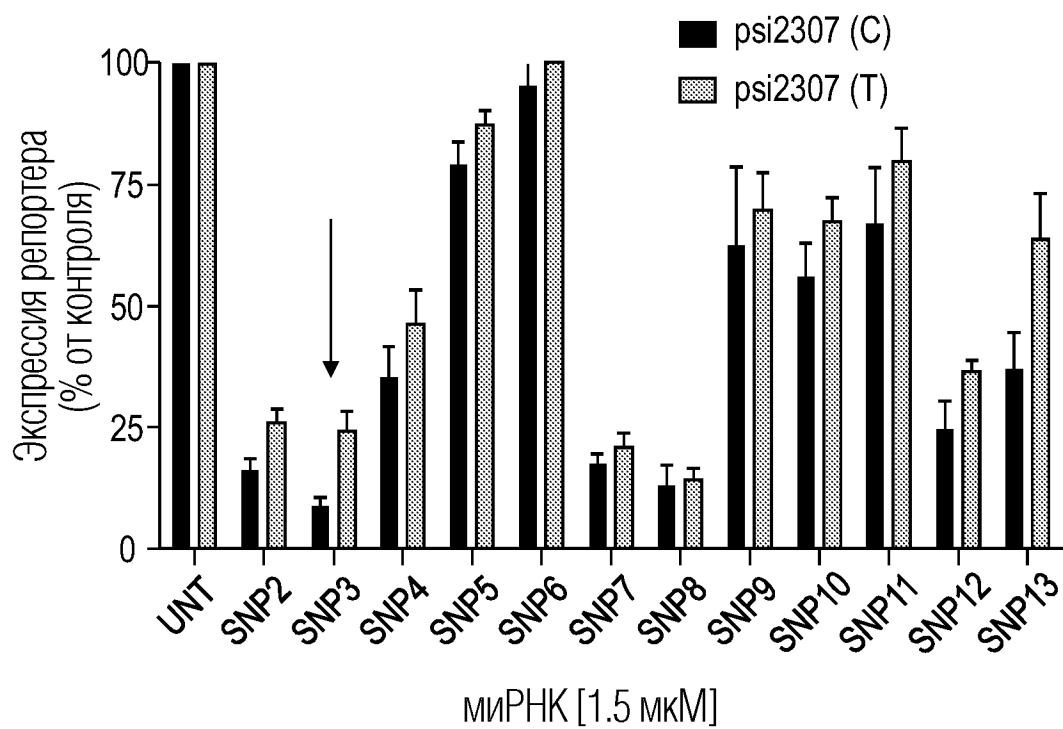
Разветвляющиеся группы



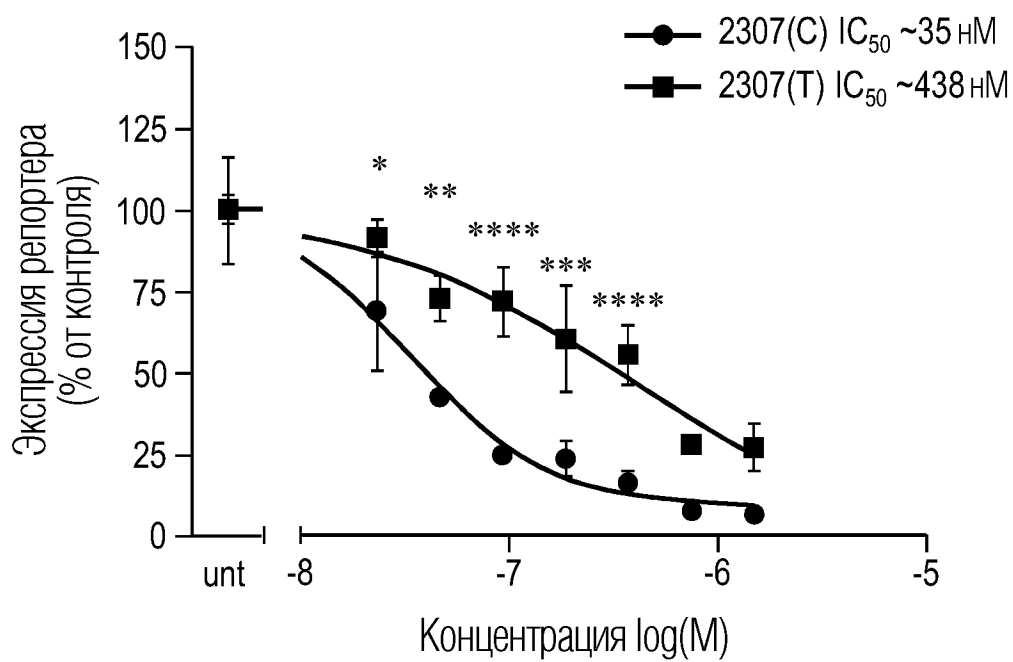
ФИГ. 38



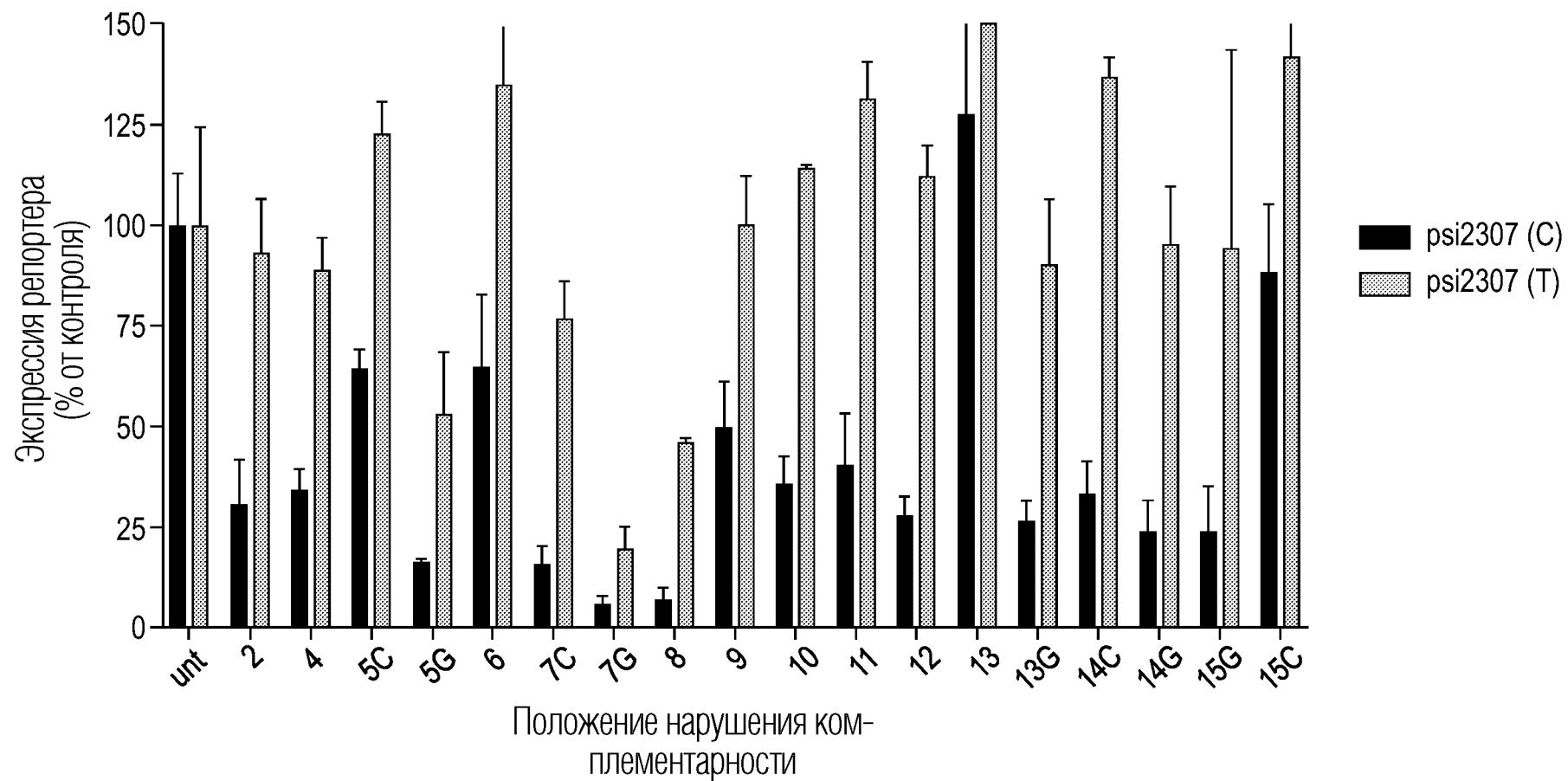
ФИГ. 39



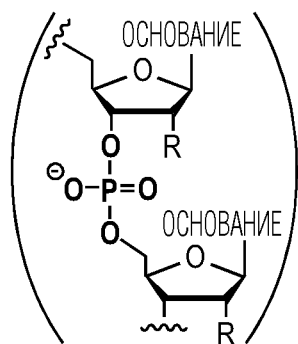
ФИГ. 40



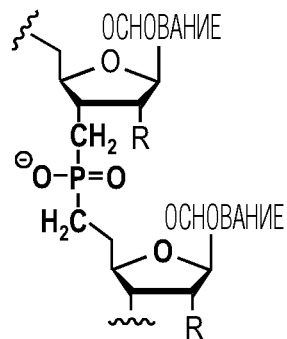
ФИГ. 41



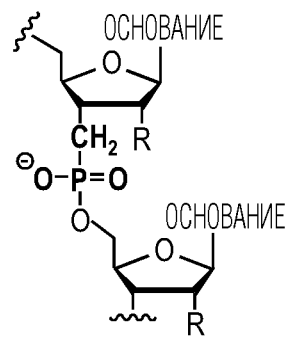
ФИГ. 42



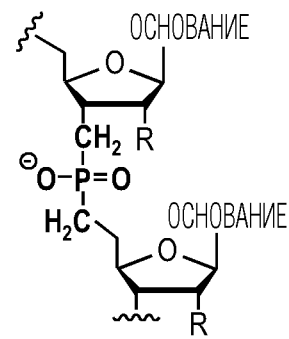
Канонический
фосфодиэфир
(oPo)



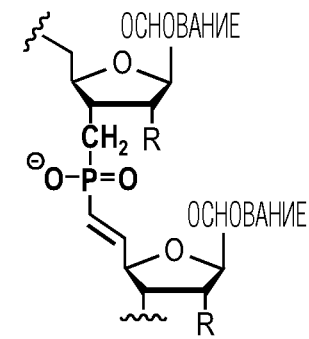
Фосфинат (cPc)



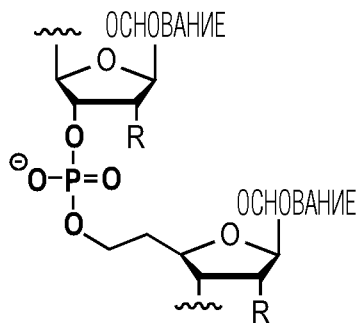
3'-С-Фосфонат
(cPo)



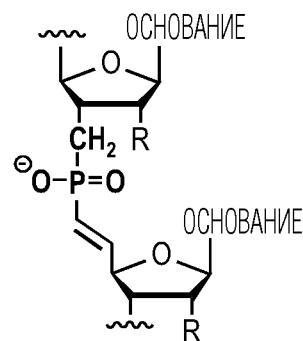
5-Фосфонат (oPc)



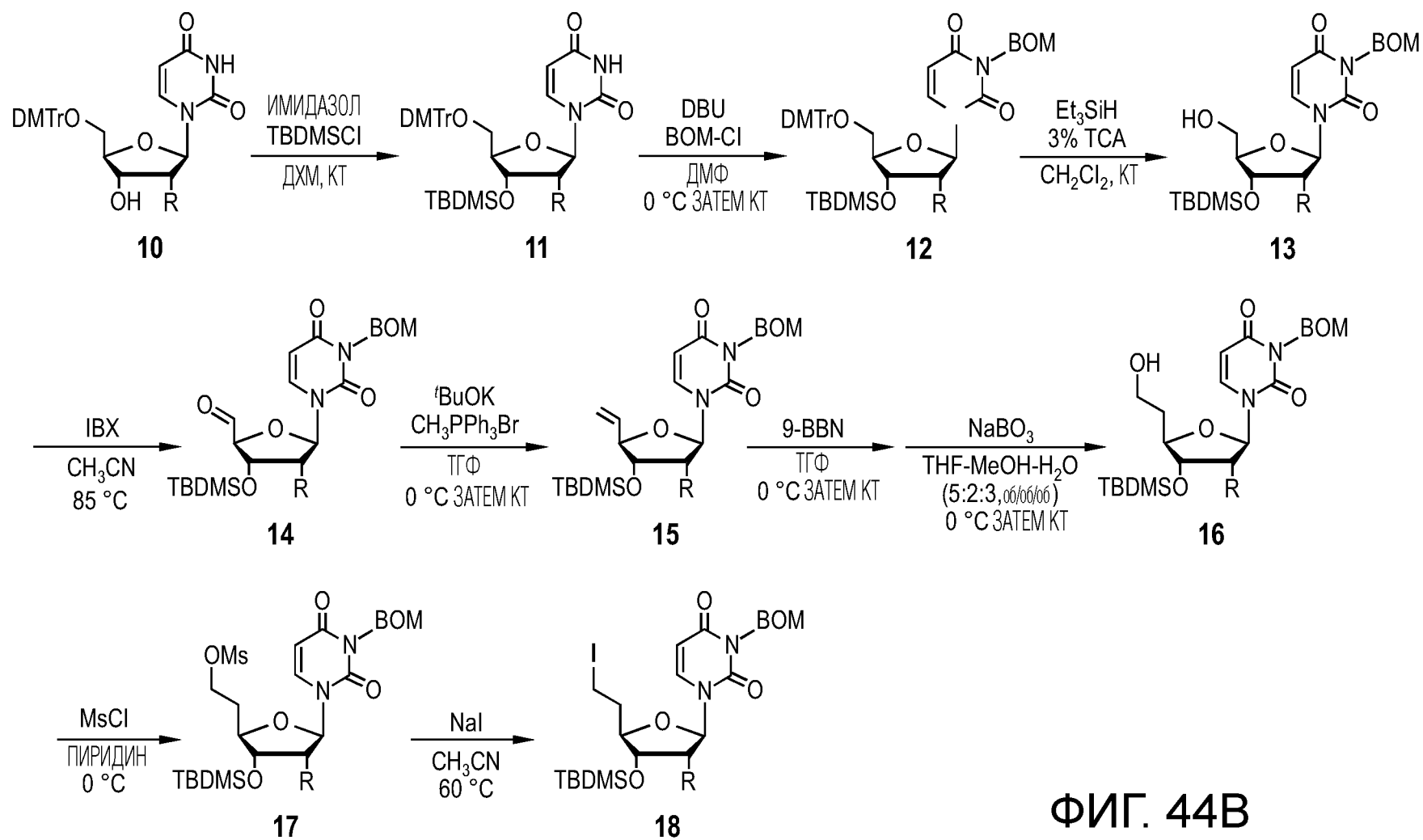
(E)-винилфосфонат
(E-VP)



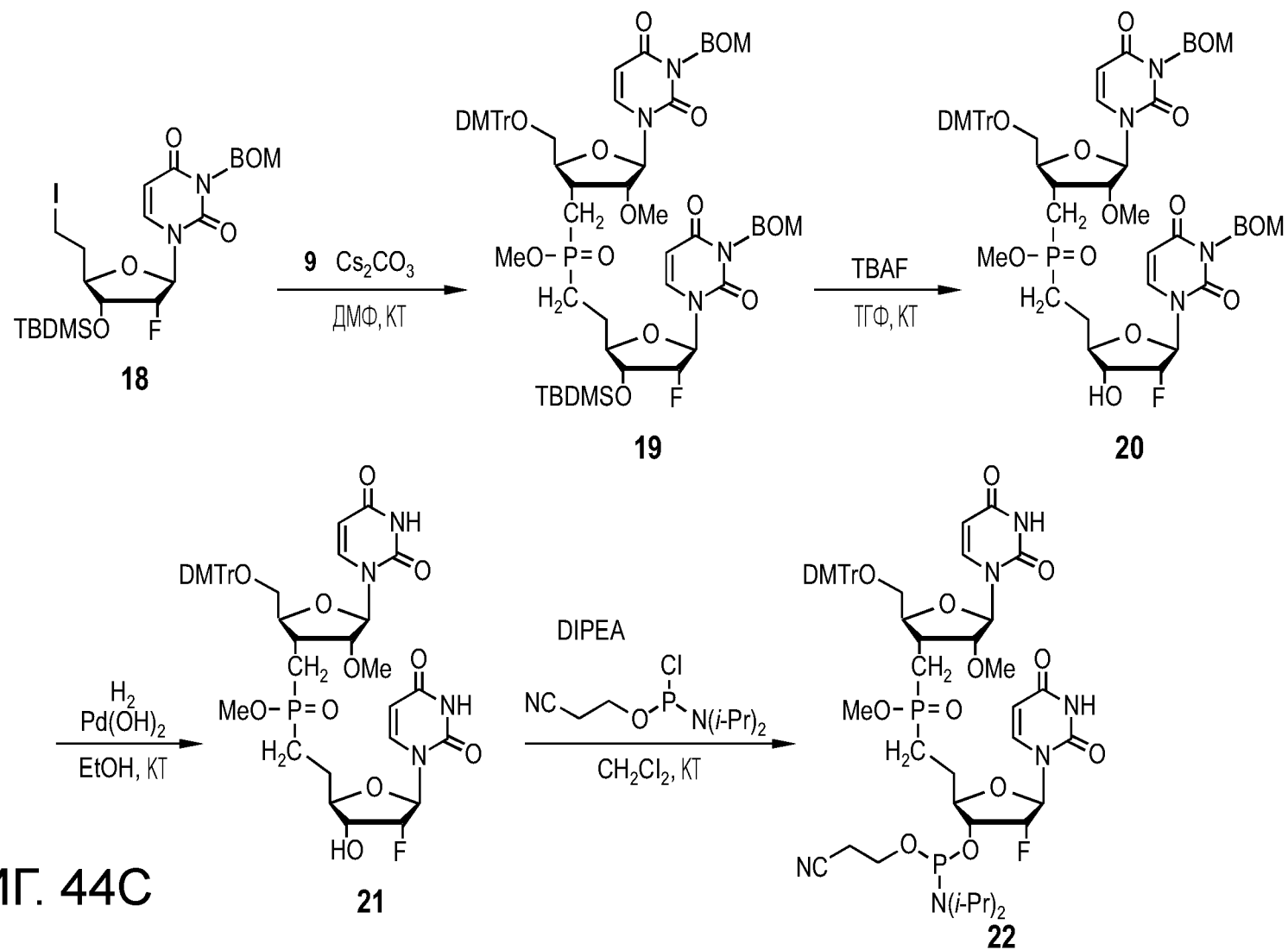
увеличенная нуклеино-
вая кислота (ex-NA)



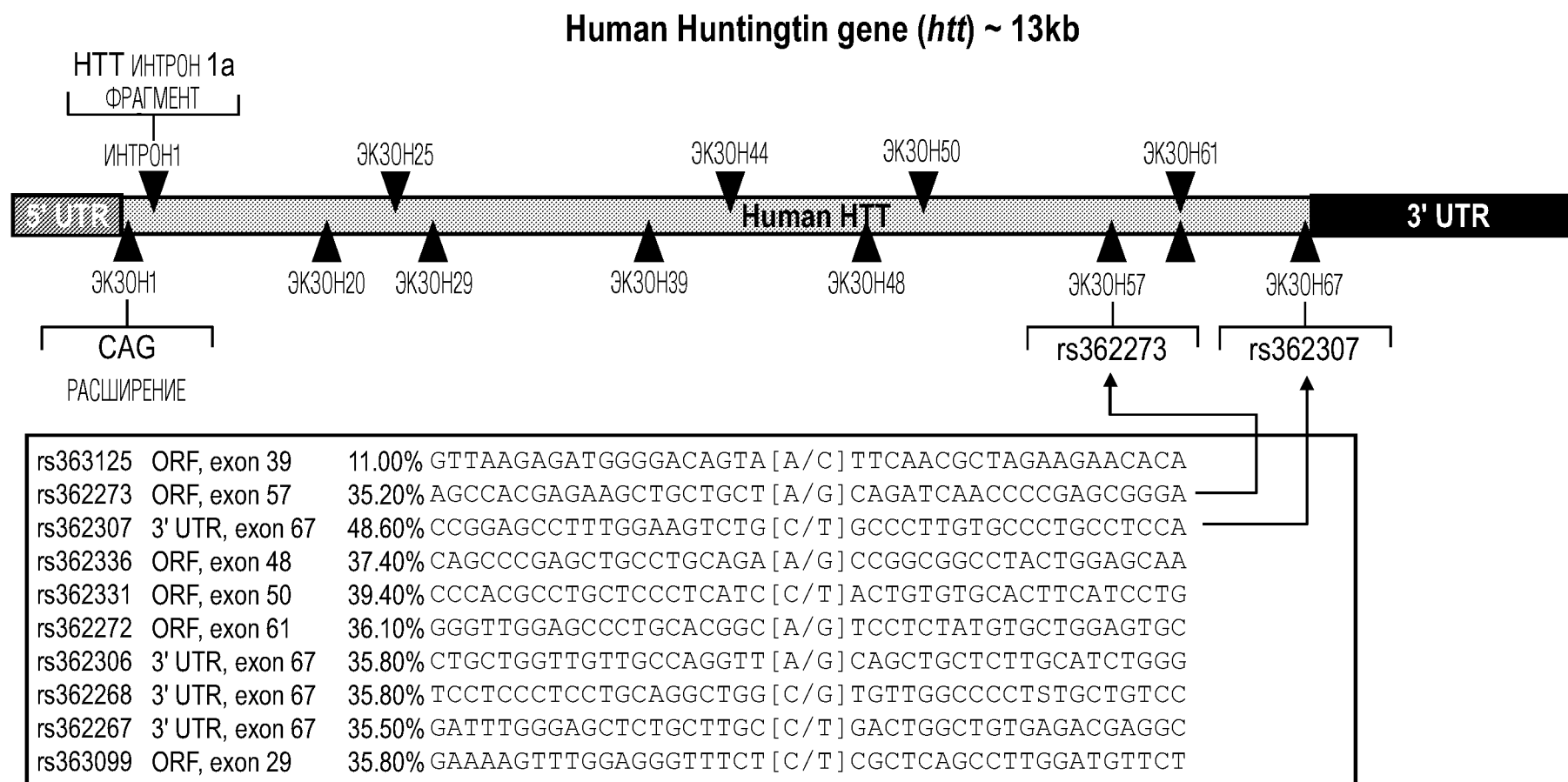
(E)-Винилфосфинат



ФИГ. 44В



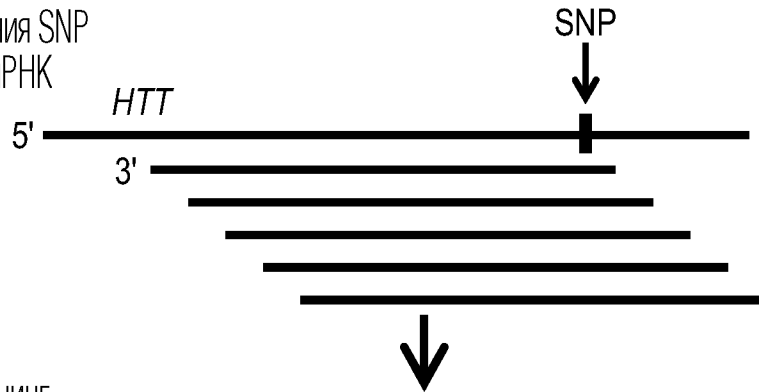
ФИГ. 44С



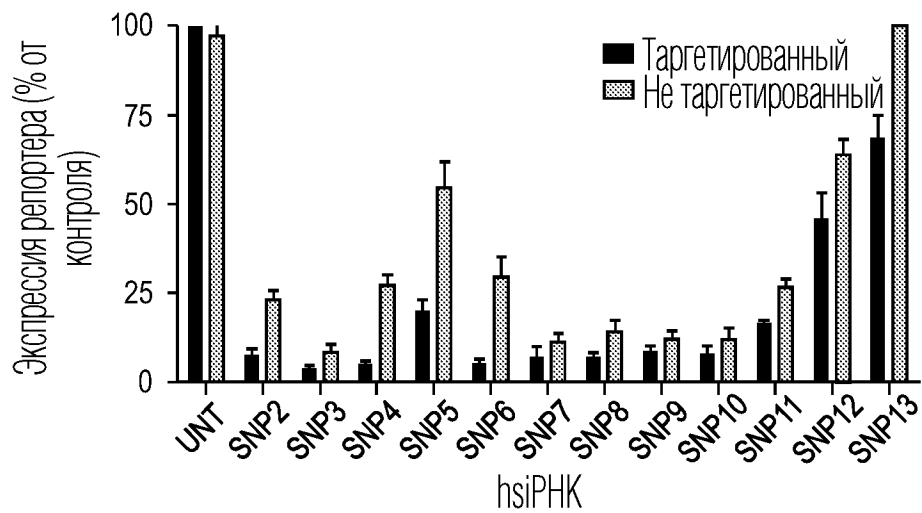
ФИГ. 45

53/57

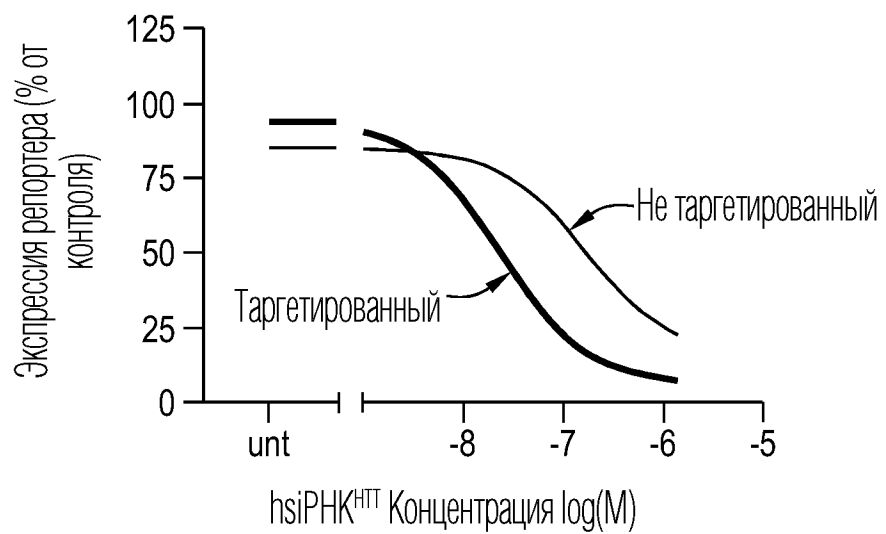
Способ конструирования SNP
дискриминации миРНК



1. Первичный скрининг



2. Селекция первичного положения нарушения комплементарности



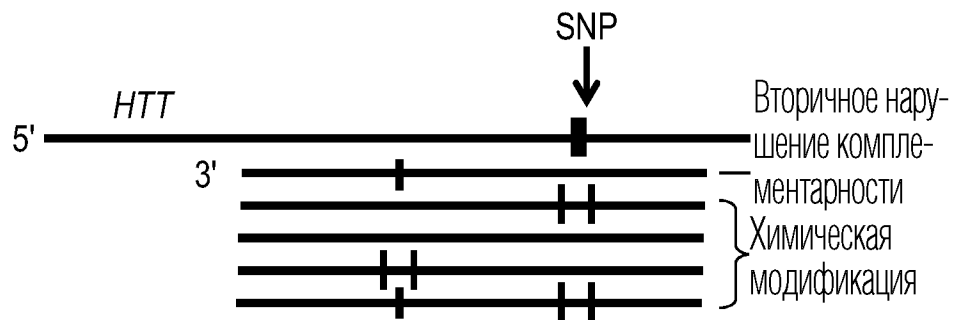
ФИГ. 46

(Продолжение на листе 54/57)

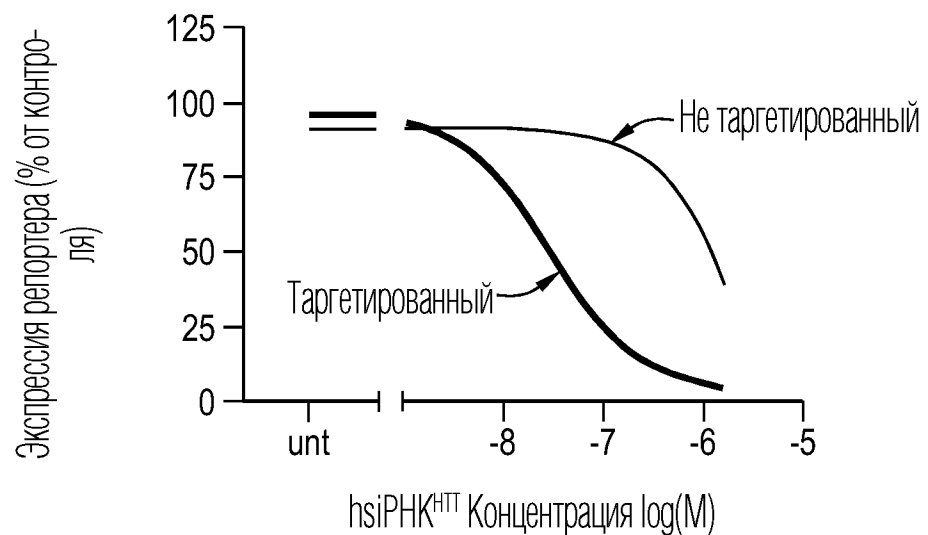
(Продолжение с листа 53/57)



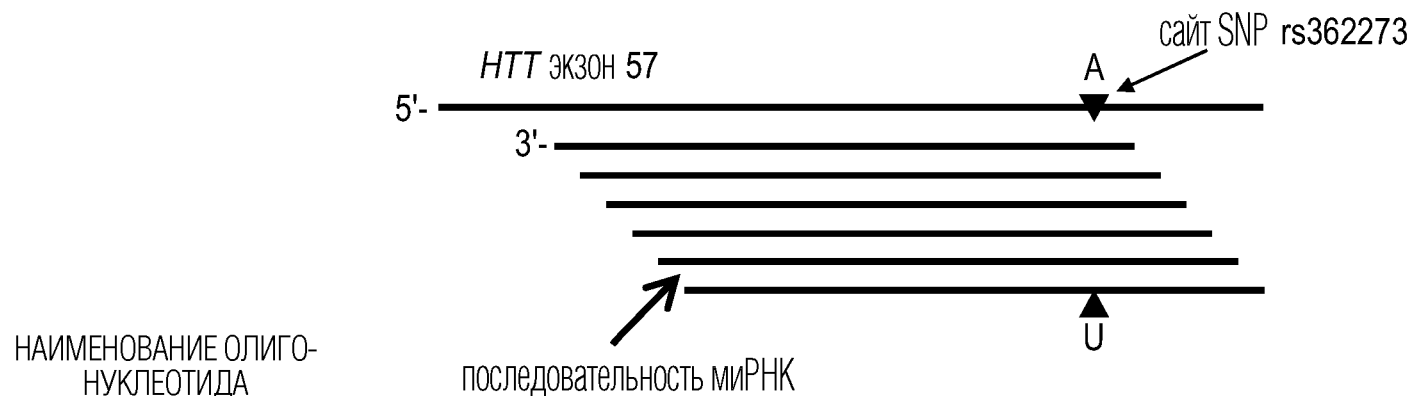
3. Химическая и структурная оптимизация для снижения аффинность к не таргетному аллелю (вторичный скрининг)



4. Выбор кандидатов с улучшенной селективностью и/или эффективностью



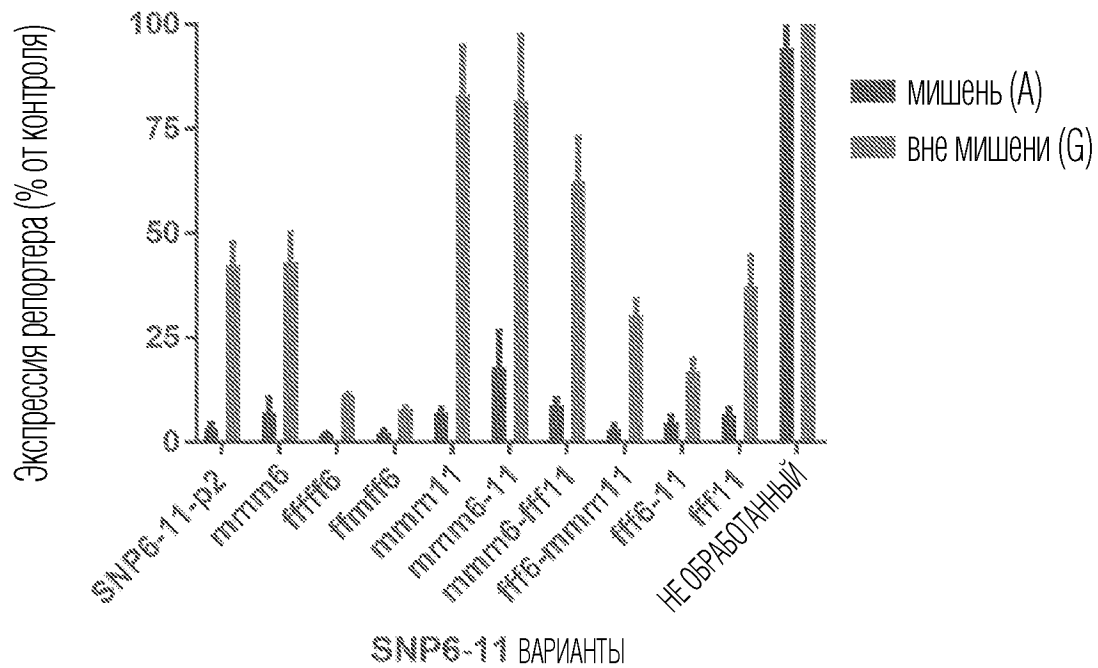
ФИГ. 46



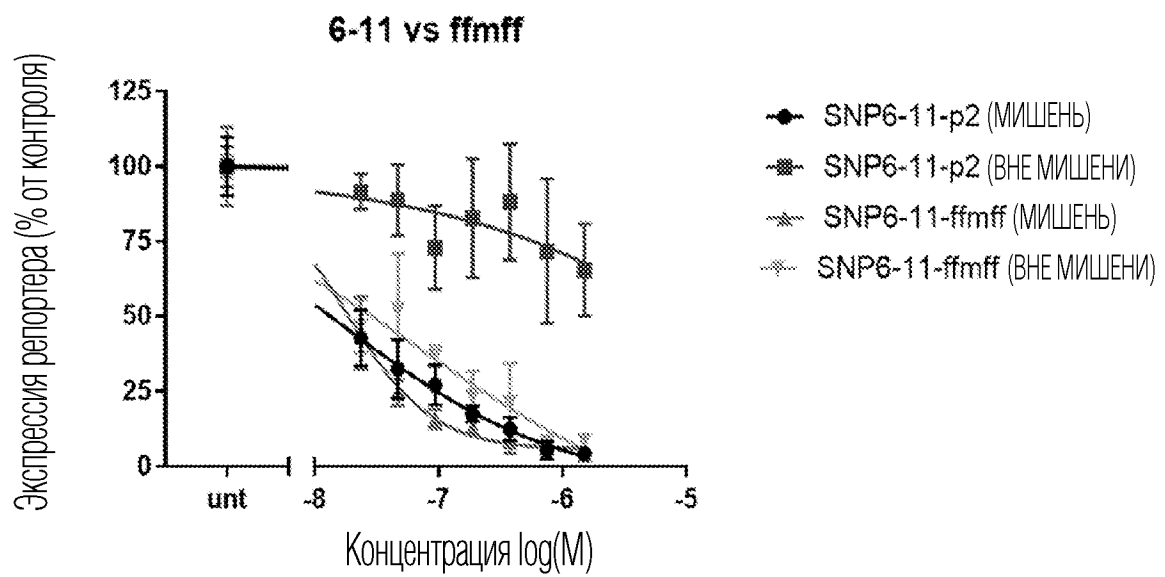
	модифицированная последовательность
SNP2	P(mU)#(fU)#(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fU)(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)#(mG)#(fG)
SNP3	P(mU)#(fG)#(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mU)#(fU)#(mC)#(fU)#(mC)#(fG)#(mU)#(fG)
SNP4	P(mU)#(fU)#(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)#(mG)#(fU)
↓	P(mU)#(fC)#(mU)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)#(fC)#(mU)#(fU)#(mC)#(fU)#(mC)#(fG)
	P(mU)#(fU)#(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)#(mU)#(fC)
	P(mU)#(fA)#(mU)(fC)(mU)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)(fG)(mC)#(fA)#(mG)#(fC)#(mU)#(fU)#(mC)#(fU)
	P(mU)#(fG)#(mA)(fU)(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)(fA)(mG)#(fC)#(mA)#(fG)#(mC)#(fU)#(mU)#(fC)
	P(mU)#(fU)#(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fG)(mU)(fA)(mG)(fC)(mA)#(fG)#(mC)#(fA)#(mG)#(fC)#(mU)#(fU)
	P(mU)#(fU)#(mU)(fG)(mA)(fU)(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)(fG)(mC)#(fA)#(mG)#(fC)#(mA)#(fG)#(mC)#(fU)
	P(mU)#(fG)#(mU)(fU)(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fG)(mU)(fA)(mG)#(fC)#(mA)#(fG)#(mC)#(fA)#(mG)#(fC)
	P(mU)#(fG)#(mG)(fU)(mU)(fG)(mA)(fU)(mC)(fU)(mG)(fU)(mA)#(fG)#(mC)#(fA)#(mG)#(fC)#(mA)#(fG)
SNP13	P(mU)#(fG)#(mG)(fG)(mU)(fU)(mG)(fA)(mU)(fC)(mU)(fG)(mU)#(fA)#(mG)#(fC)#(mA)#(fG)#(mC)#(fA)

красное=положение SNP

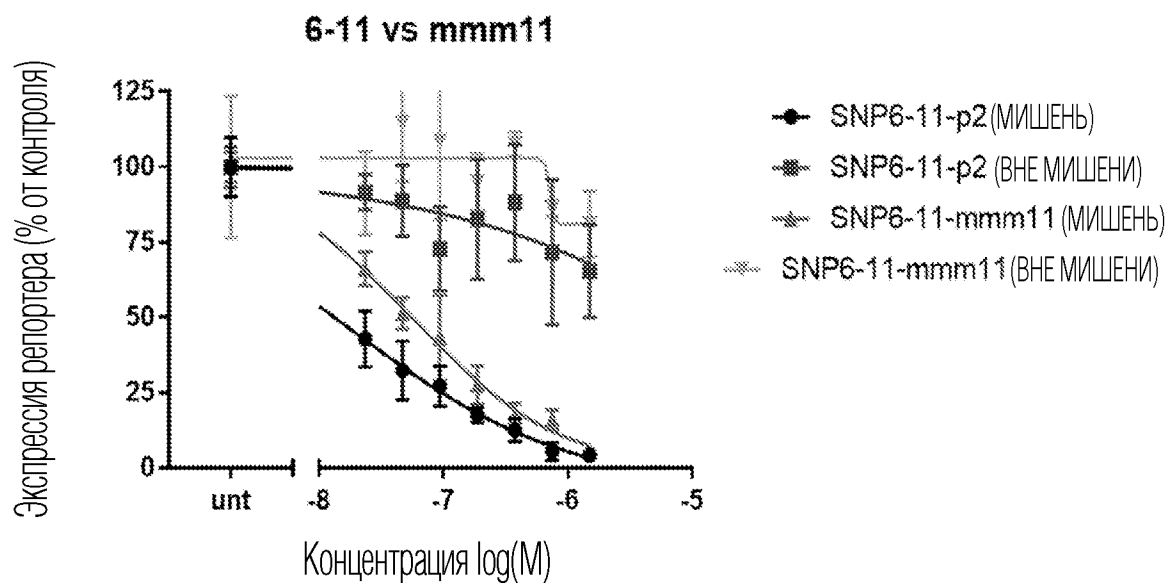
ФИГ. 47



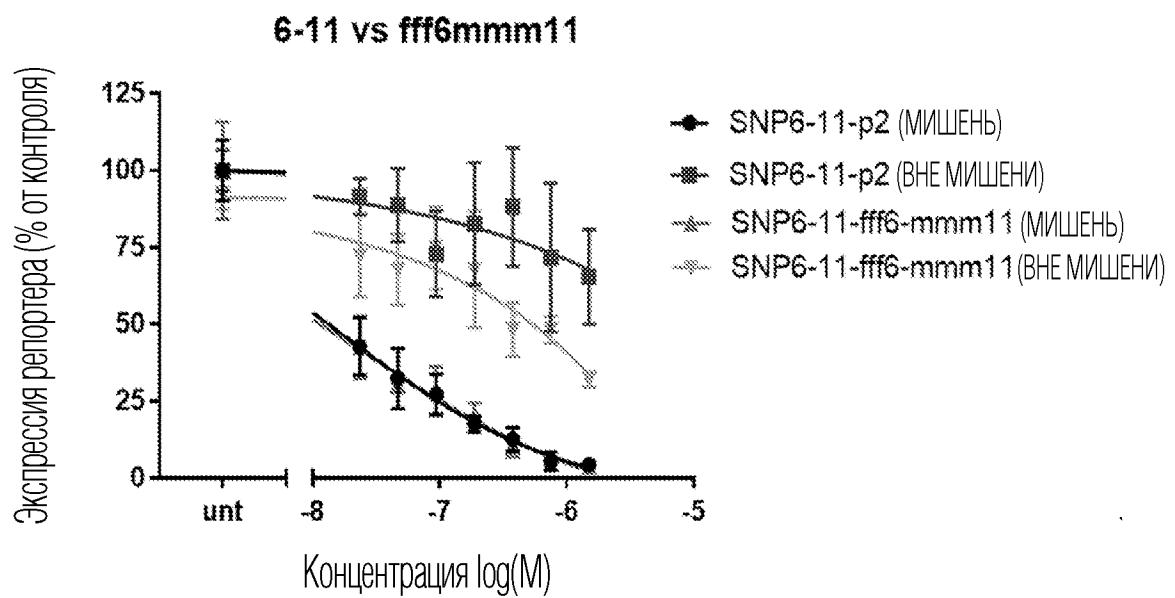
ФИГ. 48А



ФИГ. 48В



ФИГ. 48С



ФИГ. 48D