

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292543 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.30

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/61 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.05

(54) КОМПОЗИЦИИ нРНК К КЕТОГЕКСОКИНАЗЕ (КГК) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/985,948

(32) 2020.03.06

(33) US

(86) PCT/US2021/020983

(87) WO 2021/178736 2021.09.10

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

(72) Изобретатель:
Тремблэй Фредерик, Макининч
Джеймс Д. (US)

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

(57) Изобретение относится к средствам РНКи, например дцРНК средствам, направленным на ген кетогексокиназы (КГК). Изобретение также относится к способам применения таких средств РНКи для ингибирования экспрессии гена КГК и к способам лечения или предупреждения заболевания, связанного с КГК, у субъекта.

A1

202292543

202292543

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575694EA/085

КОМПОЗИЦИИ иРНК К КЕТОГЕКСОКИНАЗЕ (КГК) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США 62/985,948, поданной 6 марта 2020 года, все содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством отсылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 26 января 2021 года, названа 121301-10120_SL.txt и имеет размер 266695 байтов.

Уровень техники

Эпидемиологические исследования показали, что западная культура питания является одной из основных причин современной пандемии ожирения. Предполагается, что увеличение потребления фруктозы, связанное с употреблением обогащенных безалкогольных напитков и обработанных пищевых продуктов, является основным фактором, способствующим эпидемии. Получаемые при переработке кукурузы подсластители с высоким содержанием фруктозы начали широко применять в пищевой промышленности в 1967 году. Хотя глюкоза и фруктоза имеют одинаковую калорийность на молекулу, два сахара превращаются по-разному и используют разные переносчики глюкозы (GLUT). Фруктоза почти исключительно превращается в печени, и, в отличие от пути метаболизма глюкозы, путь метаболизма фруктозы не регулируется путем ингибирования продуктом по типу обратной связи (Khaitan Z *et al.*, (2013) *J. Nutr. Metab.* 2013, Article ID 682673, 1-12). Тогда как гексокиназа и фосфофруктокиназа (ФФК) регулируют синтез глицеральдегида-3-Р из глюкозы, фруктокиназа или кетогексокиназа (КГК), которые отвечают за фосфорилирование фруктозы до фруктозо-1-фосфата в печени, не подвергаются негативной регуляции при повышении концентраций фруктозо-1-фосфата. В результате вся поступающая в клетку фруктоза быстро фосфорилируется (Cirillo P. *et al.*, (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 545-553). Продолжающаяся утилизация АТФ для фосфорилирования фруктозы до фруктозо-1-фосфата приводит к истощению внутриклеточных фосфатов, истощению АТФ, активации АМФ-деаминазы и образованию мочевой кислоты (Khaitan Z. *et al.*, (2013) *J. Nutr. Metab.* Article ID 682673, 1-12). Повышенное содержание мочевой кислоты дополнительно стимулирует активацию КГК (Lanaspa M.A. *et al.*, (2012) *PLOS ONE* 7(10): 1-11) и вызывает дисфункцию эндотелиальных клеток и адипоцитов. Фруктозо-1-фосфат впоследствии превращается в глицеральдегид под действием альдолазы В и фосфорилируется до глицеральдегид-3-фосфата. Последний подвергается превращению по пути гликолиза с образованием пирувата, который вступает в цитратный цикл Кребса, из которого, в условиях достаточного питания, цитрат

экспортируется в цитозоль из митохондрий, давая ацетилкофермент А для липогенеза (Фигура 1).

Фосфорилирование фруктозы при участии КГК и последующая активация липогенеза приводит, например, к жировой инфильтрации печени, гипертриглицеридемии, дислипидемии и инсулинорезистентности. Также было показано, что провоспалительные изменения в клетках проксимальных канальцев почек вызваны активностью КГК (Cirillo P. *et al.*, (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 545-553). Фосфорилирование фруктозы при участии КГК связано с такими заболеваниями, нарушениями или патологиями, как заболевания печени (например, стеатоз печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, повышенный уровень холестерина ЛПНП, пониженный уровень холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистые заболевания (например, артериальная гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения в проксимальных канальцах, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерная тяга к сладкому.

Таким образом, в уровне техники существует потребность в композициях и способах лечения заболеваний, нарушений и патологических состояний, связанных с активностью КГК.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены композиции иРНК, которые действуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего кетогексокиназу (КГК). Кетогексокиназа (КГК) может находиться внутри клетки, например клетки субъекта, такого как человек.

В одном аспекте изобретения предложено средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии кетогексокиназы в клетке, где дцРНК средство включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем 1, 2 или 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии кетогексокиназы в клетке, где указанная дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь включает область комплементарности с мРНК, кодирующей кетогексокиназу, и где область комплементарности включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов,

отличающихся не больше чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии кетогексокиназы в клетке, где указанная дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 943-965; 788-810; 734-756; 1016-1038; 1013-1035; 1207-1229; 1149-1171; 574-596; 1207-1229 или 828-850 из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь включают по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем 0, 1, 2 или 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранных из группы, состоящей из AD-252498.1, AD-252339.1, AD-252285.1, AD-252531.1, AD-254265.1, AD-254403.1, AD-252627.1, AD-252146.1, AD-252666.1 и AD-252379.1.

В одном варианте осуществления дцРНК средство включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи включают модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, разомкнутого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, затрудненного этил-нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, включающего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, включающего

фосфоротиоатную группу, нуклеотида, включающего метилфосфонатную группу, нуклеотида, включающего 5'-фосфат, нуклеотида, включающего миметик 5'-фосфата, термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-O-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

В одном варианте осуществления модификации на нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из ЛНК, гликольнуклеиновой кислоты (GNA), гекситнуклеиновой кислоты (HNA), 2'-метоксиэтила, 2'-O-алкила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксид и гликоля; и их комбинаций.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), например, Ggn, Cgn, Tgn или Agn, и, винилфосфонат-нуклеотида; и их комбинаций.

В другом варианте осуществления по меньшей мере одна из модификаций на нуклеотидах является термически дестабилизирующей модификацией нуклеотида.

В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из абазической модификации; некомплементарности с противостоящим нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, разомкнутых нуклеиновых кислот (UNA) и глицерин-нуклеиновой кислоты (GNA).

Двухцепочечная область может иметь длину 19-30 пар нуклеотидов; 19-25 пар нуклеотидов; 19-23 пары нуклеотидов; 23-27 пар нуклеотидов; или 21-23 пары нуклеотидов.

В одном варианте осуществления каждая цепь независимо имеет длину не больше 30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида.

Область комплементарности может иметь длину по меньшей мере 17 нуклеотидов; от 19 до 23 нуклеотидов; или 19 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

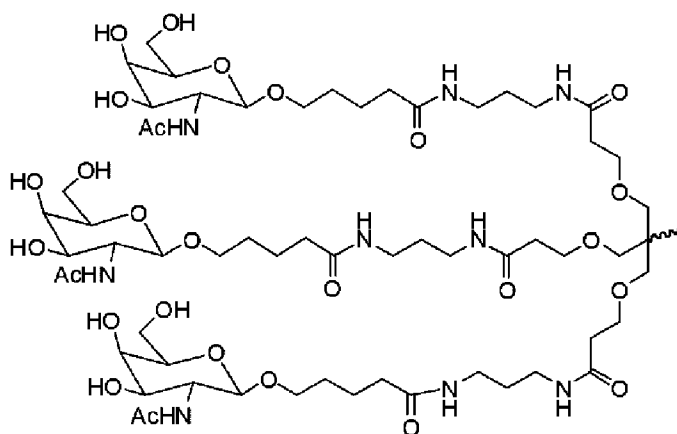
В одном варианте осуществления дцРНК средство дополнительно включает лиганд.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи дцРНК средства.

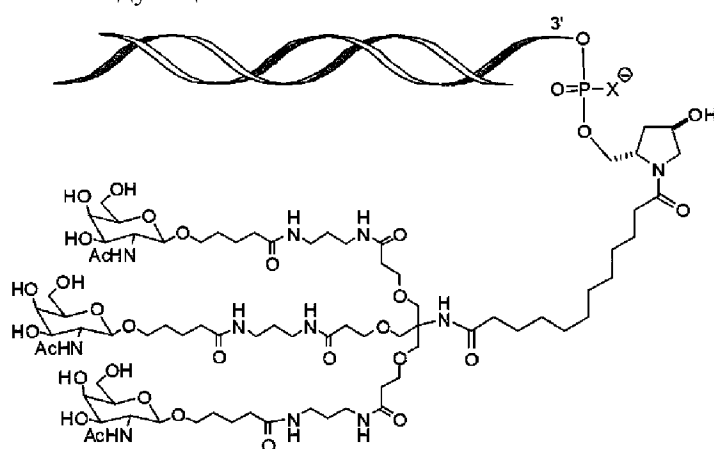
В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенными через моновалентный, бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления дцРНК средство конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и, где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления дцРНК средство дополнительно включает по меньшей мере одну фосфоротиаотную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте осуществления фосфоротиаотная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь расположена на 3'-конце одной цепи, например антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В другом варианте осуществления фосфоротиаотная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь расположена на 5'-конце одной цепи, например антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В одном варианте осуществления фосфоротиаотная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь расположена на 5'- и 3'-конце одной цепи. В одном варианте осуществления цепь является антисмысловой цепью.

В одном варианте осуществления пара азотистых оснований в 1-ом положении 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса является парой азотистых оснований AU.

В настоящем изобретении также предложены клетки, содержащие любое из дцРНК средство согласно изобретению, и фармацевтические композиции, включающие любое из дцРНК средство согласно изобретению.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению может включать дцРНК средство в безбуферном растворе, например, солевом растворе или воде, или фармацевтическая композиция согласно изобретению может включать дцРНК средство в буферном растворе, например, буферном растворе, включающем ацетат, цитрат, протамин, карбонат или фосфат, или их любую комбинацию; или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы (КГК) в клетке. Способ включает контакт клетки с любой из дцРНК согласно изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно изобретению, ингибируя, таким образом, экспрессию гена КГК в клетке.

В одном варианте осуществления клетка у субъекта например, субъекта человека, например, субъекта, имеющего ассоциированное с кетогексокиназой заболевание, такое как ассоциированное с кетогексокиназой заболевание, выбранное из группы, состоящей из заболевания печени (например, стеатоза печени, стеатогепатита, в особенности неалкогольного стеатогепатита (НАСГ)), дислипидемии (например, гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета 2-го типа), сердечно-сосудистого заболевания (например, артериальной гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев, хронического нарушения функции почек), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерной тяги к сладкому.

В одном варианте осуществления контакт клетки с дцРНК средством ингибирует экспрессию КГК по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном варианте осуществления ингибирование экспрессии кетогексокиназы снижает уровень белка КГК в сыворотке субъекта по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы (КГК). Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из дцРНК согласно изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно изобретению, осуществляя, таким образом, лечение субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы (КГК). Способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества любой из дцРНК согласно изобретению или любой из фармацевтических композиций согласно изобретению,

предотвращая, таким образом, по меньшей мере один симптом у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК.

В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК субъекту вызывает снижение обмена фруктозы. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение уровня КГК у субъекта, в особенности КГК печени, в особенности С-изоформы КГК (КГК-С) у субъекта с повышенной КГК. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение обмена фруктозы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение уровня мочевой кислоты, например мочевой кислоты сыворотки, у субъекта с повышенной мочевой кислотой сыворотки, например, повышенной мочевой кислоты сыворотки, связанной с подагрой. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию липидов сыворотки, например, триглицеридов, включая постпрандиальные триглицериды, ЛПНП, ЛПВП или холестерин, у субъекта по меньшей мере с одним не соответствующим норме уровнем липида сыворотки. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию депонирования липидов, например, уменьшение депонирования липидов в печени (например, снижение НАЖБП или НАСГ), уменьшение депонирования висцерального жира, снижение массы тела. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию инсулинового ответа или ответа на глюкозу у субъекта с нарушением инсулинового ответа, не связанной с иммунным ответом на инсулин или нарушением ответа на глюкозу. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК приводит к улучшению функции почек или прекращению или снижению скорости потери функции почек. В некоторых вариантах осуществления дцРНК вызывает уменьшение артериальной гипертензии, т.е. повышенного артериального давления.

В одном варианте осуществления нарушение является нарушением, ассоциированным с кетогексокиназой (КГК). В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированное заболевание является заболеванием печени, например, стеатозом печени, таким как НАЖБП или НАСГ. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является дислипидемия, например, повышенные триглицериды сыворотки, повышенные ЛПНП сыворотки, повышенный холестерин сыворотки, пониженные ЛПВП сыворотки, постпрандиальная гипертриглицеридемия. В другом варианте осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является нарушение гликемического контроля, например, инсулинорезистентность, не связанная с иммунным ответом против инсулина, резистентность к глюкозе, диабет 2-го типа. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является сердечно-сосудистое заболевание, например, артериальная гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированное заболевание является заболеванием почек, например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев, хроническое нарушение функции почек. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является метаболический синдром. В некоторых вариантах

осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является нарушение или дисфункция депонирования липидов, например, депонирования висцерального жира, стеатоз печени, ожирение. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является заболевание, связанное с повышенным уровнем мочевой кислоты, например, подагра, гиперурикемия. В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированным заболеванием является расстройство пищевого поведения, такое как чрезмерная тяга к сладкому.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления дцРНК средство вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В одном варианте осуществления дцРНК средство вводят субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления способы согласно изобретению включают дополнительное определение уровня кетогексокиназы в образце(ах) от субъекта.

В одном варианте осуществления уровень кетогексокиназы у образце(ах) субъекта является уровнем белка кетогексокиназы в образце(ах) крови или серологическом.

В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В некоторых вариантах осуществления известные в данной области методы лечения различных КГК-ассоциированных заболеваний применяют в комбинации с РНКи средствами согласно изобретению.

В различных вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают измерение уровня мочевой кислоты, в особенности уровня мочевой кислоты в сыворотке крови, у субъекта. В различных вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают измерение уровня фруктозы мочи у субъекта. В различных вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают измерение уровня липидов сыворотки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы согласно изобретению дополнительно включают измерение чувствительности к инсулину или глюкозе у субъекта. В некоторых вариантах осуществления снижение уровней экспрессии или активности обмена фруктозы указывает, что КГК-ассоциированное заболевание подвергается лечению или предупреждению.

В настоящем изобретении также предложены наборы, включающие любую из дцРНК согласно изобретению или любую из фармацевтических композиций согласно изобретению и, необязательно, инструкции по применению.

Краткое описание чертежей

На **Фигуре 1** показаны классический и альтернативный липогенные пути обмена фруктозы. В классическом пути триглицериды (ТГ) являются прямым продуктом обмена фруктозы в результате действия различных ферментов, в том числе альдолазы В (Aldo B) и синтазы жирных кислот (СЖК). В альтернативном пути мочевая кислота, образующаяся в результате обмена нуклеотидов, который проходит во время фосфорилирования фруктозы до фруктоза-1-фосфата (F-1-P), приводит к возникновению митохондриального

окислительного стресса (mtROS), который вызывает снижение активности аконитазы (ACO2) в цикле Кребса. Вследствие этого субстрат ACO2, цитрат, накапливается и высвобождается в цитозоле, где он действует в качестве субстрата для синтеза ТГ посредством активации АТФ-цитратлиазы (АЦЛ) и синтазы жирных кислот. АМФД2, АМФ-деаминаза 2; ИМФ, инозинмонофосфат; PO4, фосфат (из публикации Johnson et al. (2013) *Diabetes*. 62:3307-3315).

Фигура 2 представляет собой график, на котором показан уровень мРНК КГК человека после подкожного введения однократной дозы 10 мг/кг указанных дцРНК средств мышам.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предложены композиции иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена кетогексокиназы (КГК). Ген может находиться в клетке, например клетке у субъекта, такого как человек. Применение таких иРНК обеспечивает направленное расщепление молекул мРНК соответствующего гена (ген кетогексокиназы) у млекопитающих.

иРНК согласно изобретению были разработаны для направленного воздействия на ген кетогексокиназы человека, включая части гена, консервативные в ортологах кетогексокиназы млекопитающих других видов. Без ограничения теорией считается, что комбинация или подкомбинация вышеописанных свойств и определенных сайтов-мишеней или определенных модификаций в этих иРНК придает иРНК согласно изобретению повышенную эффективность, стабильность, активность, длительность действия и безопасность.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы лечения и предупреждения ассоциированного с кетогексокиназой нарушения, заболевания или состояний, например, заболевания печени (например, стеатоза печени, стеатогепатита, НАЖБП, НАСГ), дислипидемии (например, гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, не связанной с иммунным ответом на инсулин, диабета 2-го типа), сердечно-сосудистого заболевания (например, артериальной гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев, хронического нарушения функции почек), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, депонирования висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройства пищевого поведения и чрезмерной тяги к сладкому, с применением композиций иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена кетогексокиназы.

иРНК согласно изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), содержащую область, которая имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов или меньше,

например, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, и которая по существу комплементарна, по меньшей мере, части мРНК-транскрипта гена КГК. В некоторых вариантах осуществления РНКи средства согласно изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), содержащую область, которая имеет длину приблизительно 21-23 нуклеотида и которая по существу комплементарна, по меньшей мере, части мРНК-транскрипта гена КГК.

В некоторых вариантах осуществления одна или обе цепи двухцепочечных РНКи средств согласно изобретению имеют длину до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, и содержат область из по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов, которая по существу комплементарна, по меньшей мере, части мРНК-транскрипта гена КГК. В некоторых вариантах осуществления такие иРНК средства, имеющие более длинные антисмысловые цепи, могут включать вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение иРНК согласно изобретению обеспечивает направленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена кетогексокиназы) у млекопитающих. С помощью анализа *in vitro* авторы изобретения продемонстрировали, что иРНК, направленное воздействующие на ген КГК, могут эффективно опосредовать РНКи, приводя к значимому ингибированию экспрессии гена КГК. Таким образом, способы и композиции, включающие эти иРНК, могут применяться для лечения субъекта, имеющего ассоциированное с кетогексокиназой заболевание, например, заболевание печени (например, жировую инфильтрацию печени, стеатогепатит, НАЖБП, НАСГ), дислипидемию (например, гиперлипидемию, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, не связанную с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистое заболевание (например, артериальную гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения проксимальных канальцев, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункцию адипоцитов, депонирование висцерального жира, ожирение, гиперурикемию, подагру, расстройства пищевого поведения и чрезмерная тяга к сладкому.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы и комбинированная терапия для лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным ингибирование или снижение экспрессии гена КГК, например, ассоциированное с кетогексокиназой заболевание, такое как заболевание печени (например, жировая инфильтрация печени, стеатогепатит, НАЖБП, НАСГ), дислипидемия (например, гиперлипидемия, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения

гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, не связанная с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистое заболевание (например, артериальная гипертензия, дисфункция эндотелиальной клетки), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, депонирование висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерная тяга к сладкому, с применением композиций иРНК, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена КГК.

В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным ингибирование или снижение экспрессии гена КГК, например, заболевание печени (например, жировая инфильтрация печени, стеатогепатит, НАЖБП, НАСГ), дислипидемия (например, гиперлипидемия, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, не связанная с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистое заболевание (например, артериальная гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, депонирование висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерная тяга к сладкому.

В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК субъекту вызывает снижение обмена фруктозы. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение уровня КГК у субъекта, в особенности КГК в печени, в особенности КГК-С у субъекта с повышенной КГК. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение обмена фруктозы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает снижение уровня мочевой кислоты, например, мочевой кислоты сыворотки, у субъекта с повышенным уровнем мочевой кислоты сыворотки, например, повышенным уровнем мочевой кислоты сыворотки, связанным с подагрой. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию липидов сыворотки, например, триглицеридов, включая постпрандиальные триглицериды, ЛПНП, ЛПВП или холестерин, у субъекта по меньшей мере с одним отклоняющимся от нормы уровнем липида сыворотки. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию депонирования липидов, например, уменьшение депонирования липидов в печени (например, уменьшение НАЖБП или НАСГ), уменьшение депонирования висцерального жира, снижение массы тела. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК вызывает нормализацию инсулинового ответа или ответа

на глюкозу у субъекта с нарушением инсулинового ответа, не связанным с иммунным ответом на инсулин, или нарушением ответа на глюкозу. В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК приводит к улучшению функции почек или остановке или снижению скорости потери функции почек. В некоторых вариантах осуществления дцРНК вызывает уменьшение артериальной гипертензии, т.е. повышенного артериального давления.

В следующем подробном описании раскрыты способы получения и применения композиций, содержащих иРНК, для ингибирования экспрессии гена КГК, а также композиции, применения и способы лечения субъектов, у которых может быть эффективным ингибирование и/или снижение экспрессии гена КГК, например, субъекты, предрасположенные к развитию или с диагнозом ассоциированного с кетогексокиназой заболевания.

I. Определения

Для облегчения понимания настоящего изобретения сначала даны определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что в каждом случае, когда указано значение или диапазон значений некоего параметра, подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также должны быть частью настоящего изобретения.

Артикли "a" и "an" при использовании в настоящем документе относятся к одному или больше чем одному (т.е. по меньшей мере одному) грамматическому объекту артикля. Например, "элемент" означает один элемент или больше одного элемента, например, множество элементов.

Термин "включающий" используется в настоящем документе для обозначения и используется попеременно с фразой "включающий, но не ограниченный этим".

Термин "или" используется в настоящем документе для обозначения и используется попеременно с термином "и/или", если из контекста прямо не следует иное. Например, "смысловая цепь или антисмысловая цепь" понимается как "смысловая цепь или антисмысловая цепь или смысловая цепь и антисмысловая цепь".

Термин "приблизительно" используется в настоящем документе для обозначения отклонения в пределах типичных диапазонов допусков в данной области техники. Например, "приблизительно" можно понимать как приблизительно 2 стандартных отклонения от среднего значения. В некоторых вариантах осуществления приблизительно означает $\pm 10\%$. В некоторых вариантах осуществления приблизительно означает $\pm 5\%$. Если приблизительно присутствует перед рядом чисел или диапазоном значений, то подразумевается, что "приблизительно" может относиться к каждому из чисел в ряду или диапазоне значений.

Термины "по меньшей мере", "не меньше чем" или "или больше" перед числом или рядом чисел подразумевают включение числа, примыкающего к термину "по меньшей мере", а также всех последующих чисел или целых чисел, которые могут быть включены логически, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле

нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, "по меньшей мере 19 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотидов" означает, что 19, 20 или 21 нуклеотид обладают указанным свойством. Если "по меньшей мере" присутствует перед рядом чисел или диапазоном значений, подразумевается, что "по меньшей мере" может относиться к каждому из чисел в ряду или диапазоне значений.

При использовании в настоящем документе термины "не больше чем" или "меньше чем" понимаются как значение, примыкающее к фразе, а также как логические меньшие значения или целые числа, как логично следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с оверхенгом из "не больше чем 2 нуклеотидов" имеет оверхенг из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Если "не больше чем" присутствует перед рядом чисел или диапазоном значений, подразумевается, что "не больше чем" может относиться к каждому из чисел в ряду или диапазоне значений. При использовании в настоящем документе диапазоны значений включают как верхнюю, так и нижнюю границу.

При использовании в настоящем документе методы обнаружения могут включать определение того, что количество присутствующего аналита ниже, чем уровень обнаружения такого метода.

В случае конфликта между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной последовательностью смысловой или антисмысловой цепи указанная последовательность имеет приоритет.

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

При использовании в настоящем документе термин "КГК" относится к хорошо известному гену, который кодирует кетогексокиназу, а также к его белковому продукту.

Ген КГК (кетогексокиназа) расположен на хромосоме 2p23 и кодирует кетогексокиназу, также известную как фруктокиназа. КГК представляет собой фермент фосфотрансферазу со спиртом в качестве акцептора фосфата. КГК принадлежит к семейству рибокиназ карбогидрат-киназ (Trinh et al., ACTA Cryst., D65: 201-211). Были идентифицированы две изоформы кетогексокиназы, КГК-А (вариант а) и КГК-С (вариант б), которые образуются в результате альтернативного сплайсинга полноразмерной мРНК. мРНК КГК-С экспрессируется на высоких уровнях преимущественно в печени, почках и тонком кишечнике. КГК-С имеет гораздо более низкую K_m для связывания фруктозы, чем КГК-А, и, как следствие, очень эффективна при фосфорилировании фруктозы, поступающей с пищей.

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477611 (вариант 10, XM_017004061.1; SEQ ID NO: 1; обратный комплемент, SEQ ID NO: 2).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477602 (вариант 1, XM_006712008.4; SEQ ID NO: 3; обратный комплемент, SEQ ID NO: 4).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477603 (вариант 2, XM_006712009.4; SEQ ID NO: 5; обратный комплемент, SEQ ID NO: 6).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477604 (вариант 3, XM_005264294.4; SEQ ID NO: 7; обратный комплемент, SEQ ID NO: 8).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477605 (вариант 4, XM_017004060.2; SEQ ID NO: 9; обратный комплемент, SEQ ID NO: 10).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477606 (вариант 5, XM_006712010.4; SEQ ID NO: 11; обратный комплемент, SEQ ID NO: 12).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477607 (вариант 6, XM_006712011.4; SEQ ID NO: 13; обратный комплемент, SEQ ID NO: 14).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477608 (вариант 7, XM_006712012.4; SEQ ID NO: 15; обратный комплемент, SEQ ID NO: 16).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477609 (вариант 8, XM_005264296.4; SEQ ID NO: 17; обратный комплемент, SEQ ID NO: 18).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477610 (вариант 9, XM_006712013.4; SEQ ID NO: 19; обратный комплемент, SEQ ID NO: 20).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477612 (вариант 11, XM_006712014.4; SEQ ID NO: 21; обратный комплемент, SEQ ID NO: 22).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1370477613 (вариант 12, XM_005264298.4; SEQ ID NO: 23; обратный комплемент, SEQ ID NO: 24).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК-С человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1519473652 (вариант b, NM_006488.3; SEQ ID NO: 25; обратный комплемент, SEQ ID NO: 26).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК-А человека можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1676318137 (вариант a, NM_000221.3; SEQ ID NO: 27; обратный комплемент, SEQ ID NO: 28).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК мыши (*Mus musculus*) можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 887229617 (вариант 1, NM_001310524.1; SEQ ID NO: 29; обратный комплемент, SEQ ID NO: 30).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК крысы (*Rattus norvegicus*) можно

найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 126432547 (NM_031855.3; SEQ ID NO:31; обратный комплемент, SEQ ID NO: 32).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК кролика (*Oryctolagus cuniculus*) можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1040208599 (вариант 2, XM_017340872.1; SEQ ID NO:33; обратный комплемент, SEQ ID NO: 34).

Последовательность мРНК-транскрипта КГК резуса *Macaca mulatta* можно найти, например, по номеру доступа в GenBank GI: 1622855994 (вариант 1, XM_015111942.2; SEQ ID NO:35; обратный комплемент, SEQ ID NO: 36).

Дополнительную информацию по КГК можно найти, например, по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3795.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК КГК доступны в общедоступных базах данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и на веб-сайте проекта генома *Macaca*.

Термин "КГК" при использовании в настоящем документе также относится к природным вариациям последовательности ДНК гена КГК, таким как однонуклеотидный полиморфизм (SNP или снип) в гене КГК. Примеры снипов в последовательности ДНК КГК можно найти в базе данных dbSNP, доступной по адресу www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/.

Примеры нуклеотидных последовательностей КГК также можно найти в SEQ ID NO:1-36. SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 и 36 представляют собой обратные комплементарные последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 и 35 соответственно.

Все содержание каждого из предшествующих номеров доступа GenBank и номера в базе данных Gene включены в настоящий документ посредством отсылки от даты регистрации настоящей заявки.

При использовании в настоящем документе "последовательность-мишень" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся во время транскрипции гена кетогексокиназы, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет иметь, по меньшей мере, достаточную длину, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этой части или около этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образовавшейся во время транскрипции гена КГК. В одном варианте осуществления последовательность-мишень находится в кодирующей белок области КГК.

Последовательность-мишень может иметь длину от приблизительно 19-36 нуклеотидов, например, приблизительно 19-30 нуклеотидов. Например, последовательность-мишень может иметь длину приблизительно 19-30 нуклеотидов, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность-

мишень имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 30 нуклеотидов. В других вариантах осуществления последовательность-мишень имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов. В других вариантах осуществления последовательность-мишень имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень имеет длину от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть изобретения.

При использовании в настоящем документе термин "цепь, включающая последовательность" относится к олигонуклеотиду, включающему цепь нуклеотидов, описанную последовательностью, приведенной с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый "G", "C", "T" и "U" обычно обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Впрочем, следует понимать, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как дополнительно описано ниже, или к суррогатному замещающему остатку (см., например, Таблицу 1). Специалисту в данной области техники хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими остатками без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, включающего нуклеотид, несущий такой замещающий остаток. Например, без ограничения, нуклеотид, включающий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях двухцепочечной РНК, представленных в изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом участке олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие замещающие остатки, подходят для композиций и способов, представленных в изобретении.

Термины "иРНК", "РНКи средство", "иРНК средство", "средство РНК-интерференции" при попеременном использовании в настоящем документе относятся к средству, которое содержит РНК, согласно определению данного термина в настоящем документе, и которое опосредует направленное расщепление РНК-транскрипта по пути РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет сиквенспецифическое расщепление последовательности мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например ингибирует, экспрессию гена кетогексокиназы в клетке, например, в клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство РНК-интерференции согласно изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с

последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени кетогексокиназы, направляя расщепление РНК-мишени. Без ограничения теорией, считается, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется до миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент из семейства рибонуклеазы III, процессирует дцРНК с получением коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Затем миРНК включаются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), где одна или более геликаз раскручивают дуплекс миРНК, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, вызывая сайленсинг (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к одноцепочечной РНК (миРНК), образующейся в клетке, которая способствует образованию комплекса RISC, вызывающего выключение гена-мишени, то есть гена кетогексокиназы (КГК). Таким образом, термин "миРНК" также используется в настоящем документе для обозначения иРНК, как описано выше.

В некоторых вариантах осуществления РНКи средство может быть одноцепочечной миРНК (оцРНКи), которую вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. Одноцепочечные РНКи средства связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК обычно содержат 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Конструирование и тестирование одноцепочечных миРНК описаны в патенте США 8,101,348 и в публикации Lima et al., (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может использоваться в качестве одноцепочечной миРНК, описанной в настоящем документе или химически модифицированной способами, описанными в Lima et al., (2012) *Cell* 150:883-894.

В некоторых вариантах осуществления "иРНК" для применения в композициях, применениях и способах согласно изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и именуется в настоящем документе как "двухцепочечное РНК средство", "молекула двухцепочечной РНК (дцРНК)", "дцРНК средство" или "дцРНК". Термин "дцРНК" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих дуплексную структуру, которая включает две антипараллельных и по существу комплементарных цепей нуклеиновой кислоты, имеющих "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к РНК-мишени, то есть гену кетогексокиназы (КГК). В некоторых вариантах осуществления изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) инициирует расщепление РНК-мишени, например мРНК, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, указанного в настоящем документе как РНК-интерференция или РНКи.

Как правило, большинство нуклеотидов в каждой цепи молекулы двухцепочечной РНК являются рибонуклеотидами, однако, как подробно описано в настоящем документе,

каждая из цепей или обе цепи также могут включать один или больше нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, при использовании в настоящем описании, "иРНК" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; иРНК может включать существенные модификации множества нуклеотидов.

При использовании в настоящем документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, содержащему, независимо, модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное нуклеиновое основание, или их любую комбинацию. Таким образом, термин "модифицированный нуклеотид" включает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, остатках сахара или нуклеиновых основаниях. Модификации, пригодные для применения в средствах согласно изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных в уровне техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа мРНК, охватываются термином "иРНК" или "средство РНК-интерференции" в рамках настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления мгновенного раскрытия, включении дезоксинуклеотида - который признан как естественная форма нуклеотида - если существующий в агенте РНКи, как могут полагать, составляет модифицированный нуклеотид.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфическое расщепление требуемой РНК-мишени по пути RISC, и может иметь различную длину от приблизительно 19-36 пар азотистых оснований, например, приблизительно 19-30 пар азотистых оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар азотистых оснований, таких как приблизительно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары азотистых оснований. В некоторых вариантах осуществления дуплексная область имеет длину 19-21 пара азотистых оснований, например, 21 пара азотистых оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются в качестве части настоящего изобретения.

Две цепи, формирующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной более крупной молекулы РНК, или они могут быть отдельными молекулами РНК. Когда две цепи являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя дуплексную структуру, соединяющая цепь РНК называется "петлей шпильки". Петля шпильки может включать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или больше неспаренных

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать 10 или меньше нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать 8 или меньше неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки может содержать 4-8 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления две цепи двухцепочечного олигомерного соединения могут быть соединены вместе. Две цепи могут быть соединены друг с другом на обоих концах или только на одном конце. Связывание на одном конце означает, что 5'-конец первой цепи соединен с 3'-концом второй цепи или 3'-конец первой цепи соединен с 5'-концом второй цепи. Когда две цепи соединены друг с другом на обоих концах, 5'-конец первой цепи соединен с 3'-концом второй цепи, а 3'-конец первой цепи соединен с 5'-концом второй цепи. Две цепи могут быть соединены друг с другом олигонуклеотидным линкером, включающим, без ограничения этим, $(N)_n$; где N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а n равно 3-23. В некоторых вариантах осуществления n равно 3-10, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный линкер выбран из группы, состоящей из GNRA, (G)₄, (U)₄ и (dT)₄, где N представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а R представляет собой модифицированный или немодифицированный пуриновый нуклеотид. Некоторые нуклеотиды в линкере могут участвовать во взаимодействиях с другими нуклеотидами в линкере с образованием пар оснований. Две цепи также могут быть соединены друг с другом ненуклеозидным линкером, например линкером, описанным в настоящем документе. Специалисту в данной области будет известно, что в олигонуклеотидном линкере могут использоваться любые химические модификации или вариации олигонуклеотидов, описанные в настоящем документе.

Олигомерные соединения типа шпильки и гантели будут иметь дуплексную область, меньше или равную 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Длина дуплексной области может быть меньше или равна 200, 100 или 50. В некоторых вариантах осуществления диапазоны длин дуплексной области составляют 15-30, 17-23, 19-23 и 19-21 пару нуклеотидов.

Олигомерные соединения в форме шпилек могут иметь одноцепочечный оверхенг или концевую неспаренную область, в некоторых вариантах осуществления на 3'-конце, а в некоторых вариантах осуществления на антисмысловой стороне шпильки. В некоторых вариантах осуществления оверхенги имеют длину 1-4, обычно 2-3 нуклеотида. Олигомерные соединения в форме шпилек, которые могут индуцировать РНК-интерференцию, также именуется в настоящем документе как "мшРНК".

Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не должны быть обязательно, но могут быть ковалентно связаны. Когда две цепи соединены ковалентно с помощью средств, отличающихся от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с

образованием дуплексной структуры, такая соединяющая структура называется "линкером". Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований равно количеству нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых оверхенгов, присутствующих в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре, РНКи может включать оверхенги из одого или больше нуклеотидов. В одном варианте осуществления РНКи средства по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь РНКи средства включает 5'-оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь включает 5'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления и 3'-конец, и 5'-конец одной цепи РНКи средства включают оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления иРНК средство согласно изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой включает 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, гена кетогексокиназы (КГК), направляя расщепление РНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления иРНК средство согласно изобретению представляет собой дцРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени КГК, направляя расщепление РНК-мишени.

При использовании в настоящем документе термин "нуклеотидный оверхенг" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры двухцепочечной иРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за 5'-конец другой цепи, или наоборот, то присутствует нуклеотидный оверхенг. ДцРНК может включать выступ по меньшей мере из одного нуклеотида; в альтернативе оверхенг может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный оверхенг может включать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Оверхенг(и) может присутствовать на смысловой цепи, антисмысловой цепи или их любой комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) оверхенга могут присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

В одном варианте осуществления дцРНК по меньшей мере одна цепь включает 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь РНКи средства включает 5'-оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь включает

5'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления и 3'-конец, и 5'-конец одной цепи РНКи средства включают оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит оверхенг из 1-10 нуклеотидов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или 5'-конце. В одном варианте смысловая цепь дцРНК содержит оверхенг из 1-10 нуклеотидов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или больше нуклеотидов в оверхенге заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит оверхенг из 1-10 нуклеотидов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3'-конце или 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления оверхенг на смысловой цепи или на антисмысловой цепи, или на обеих цепях, может включать удлиненные одноцепочечные участки длиной больше 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10 -20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг находится на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг находится на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный оверхенг присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления один или больше нуклеотидов в удлиненном оверхенге заменены нуклеозидтиофосфатом. В некоторых вариантах осуществления оверхенг включает самокомплементарную часть, в результате чего оверхенг способен образовывать шпильчатую структуру, которая стабильна в физиологических условиях.

Термин "тупой" или "тупой конец" означает, что на этом конце двухцепочечного РНК средства отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т.е. нет нуклеотидного оверхенга. Двухцепочечное РНК средство с "тупыми концами" является двухцепочечным по всей своей длине, то есть нуклеотидный оверхенг не присутствует ни на одном конце молекулы. РНКи средства согласно изобретению включают РНКи средства без нуклеотидного оверхенга на одном конце (т.е. средства с одним оверхенгом и одним тупым концом) или без нуклеотидных оверхенгов на обоих концах. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

Термин "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" относится к цепи иРНК, например дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна последовательности-мишени, например, мРНК КГК.

При использовании в настоящем документе термин "область комплементарности" относится к области антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна

последовательности, например последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности кетогексокиназы, как определено в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, некомплементарные основания могут присутствовать во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, более допустимые некомплементарные основания находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4 или 3 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца иРНК. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечное РНК средство согласно изобретению включает некомплементарный нуклеотид в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного РНК средства согласно изобретению включает не больше 4 оснований, не комплементарных мРНК-мишени, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 оснований, не комплементарных мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления антисмысловое двухцепочечное РНК средство согласно изобретению включает не больше 4 оснований, не комплементарных смысловой цепи, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 оснований, не комплементарных смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления некомплементарный нуклеотид находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. В еще одном варианте осуществления некомплементарный нуклеотид является, например, 3'-концевым нуклеотидом иРНК средства. В некоторых вариантах осуществления некомплементарный нуклеотид(ы) не присутствует в затравочной области.

Таким образом, РНКи средство, описанное в настоящем документе, может содержать одно или больше оснований, не комплементарных последовательности-мишени. В одном варианте осуществления РНКи средство, описанное в настоящем документе, содержит не больше 3 некомплементарных оснований (т.е. 3, 2, 1 или 0 некомплементарных оснований). В одном варианте осуществления РНКи средство, описанное в настоящем документе, содержит не больше 2 некомплементарных оснований. В одном варианте осуществления РНКи средство, описанное в настоящем документе, содержит не больше 1 некомплементарного основания. В одном варианте осуществления РНКи средство, описанное в настоящем документе, содержит 0 некомплементарных оснований. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь РНКи средства содержит основания, не комплементарные последовательности-мишени, такие некомплементарные основания необязательно могут быть ограничены последними 5 нуклеотидами от 5'-конца или 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления, в случае РНКи средства длиной 23 нуклеотида, цепь, которая комплементарна области гена КГК, обычно не содержит каких-либо нарушений комплементарности в пределах 13 центральных нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в уровне техники, могут применяться для определения, является ли РНКи средство, содержащее основание, не комплементарное последовательности-мишени, эффективными для ингибирования экспрессии гена КГК. Оценка эффективности РНКи средств с нарушениями комплементарности при ингибировании экспрессии гена КГК важна, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене КГК

имеет полиморфную вариацию последовательности в пределах популяции.

Термин "смысловая цепь" или "сопровождающая цепь" при использовании в настоящем документе относится к цепи иРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи в соответствии с определением данного термина в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе "по существу все нуклеотиды модифицированы" соответствует значительной, но не полной модификации, и может включать не больше 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

При использовании в настоящем документе термин "область расщепления" относится к области, расположенной в непосредственной близости от сайта расщепления. Сайт расщепления представляет собой участок на мишени, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления область расщепления включает три основания на каждом конце сайта расщепления и непосредственно граничащих с ним. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит два основания на каждом конце сайта расщепления и непосредственно граничащих с ним. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, связанном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, при этом область расщепления включает нуклеотиды 11, 12 и 13.

При использовании в настоящем документе, и если не указано иное, термин "комплементарный", в случае использования для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия могут быть, например, жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей промывкой (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Могут применяться и другие условия, такие как физиологически значимые условия, которые могут присутствовать в организме. Специалист в данной области сумеет определить набор условий, более всего подходящих для проверки комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным назначением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в иРНК, например в дцРНК, как описано в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности в настоящем документе могут именоваться "полностью

комплементарными" по отношению друг к другу. Однако если первая последовательность указана в настоящем документе как "по существу комплементарная" по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они могут образовывать одну или больше, но обычно не больше 5, 4, 3 или 2, некомплементарных пар оснований при гибридизации в случае дуплекса длиной до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, ингибирования экспрессии генов *in vitro* или *in vivo*. Впрочем, когда два олигонуклеотида созданы для образования при гибридизации одного или больше одноцепочечных оверхенгов, такие оверхенги не должны считаться некомплементарными основаниями в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, включающая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид включает последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же может называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в настоящем документе.

"Комплементарные" последовательности при использовании в настоящем документе также могут включать, или могут быть полностью сформированы из неутсон-криковских пар оснований или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той степени, в какой удовлетворяются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие неутсон-криковские пары оснований включают, без ограничения перечисленными, неоднозначные пары оснований G:U или хугстиновские пары.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по существу комплементарный" в настоящем документе могут использоваться в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между двумя олигонуклеотидами или полинуклеотидами, такими как антисмысловая цепь двухцепочечного РНК средства и последовательность-мишень, как будет понятно из контекста их применения.

При использовании в настоящем документе полинуклеотид, который "по существу комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген кетогексокиназы). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК кетогексокиназы, если последовательность по существу комплементарна непрерывной части мРНК, кодирующей ген кетогексокиназы.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, полностью комплементарны последовательности-мишени КГК.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны последовательности-мишени КГК и

включают непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 или 35, или фрагмент любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 или 35, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99%.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту последовательности-мишени КГК и включают непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO: 1, выбранному из группы нуклеотидов 943-965; 788-810; 734-756; 1016-1038; 1013-1035; 1207-1229; 1149-1171; 574-596; 1207-1229 или 828-850 SEQ ID NO: 1, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98% или приблизительно на 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, по существу комплементарны последовательности-мишени КГК и включают непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или 100%.

В одном варианте осуществления РНК средство согласно настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, является таким же, как последовательность-мишень КГК, и где полинуклеотид смысловой цепи включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36, или фрагменту любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36, например комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления иРНК согласно изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен последовательности-мишени кетогексокиназы, и где полинуклеотид смысловой цепи включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-5 или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, например, комплементарна приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 91%, приблизительно на 92%, приблизительно на 93%, приблизительно на 94%, приблизительно на 95%, приблизительно на 96%, приблизительно на 97%, приблизительно на 98%, приблизительно на 99% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-252498.1, AD-252339.1, AD-252285.1, AD-252531.1, AD-254265.1, AD-254403.1, AD-252627.1, AD-252146.1, AD-252666.1 и AD-252379.1.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область двухцепочечного иРНК средства имеет длину меньше или равную 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 и больше пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного иРНК средства имеет длину меньше или равную 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь двухцепочечного иРНК средства имеет длину меньше или равную 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК средства имеют длину от 15 до 30 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК средства имеют длину от 19 до 25 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК средства имеют длину от 21 до 23 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая цепь иРНК средства имеет длину 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, причем цепи образуют двухцепочечную область из 21 последовательной пары оснований с одноцепочечным оверхенгом длиной 2 нуклеотида на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления большая часть нуклеотидов каждой цепи являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи также могут включать один или больше нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "иРНК" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных в

уровне техники. Любые подобные модификации при использовании в молекуле иРНК охвачены термином "иРНК" в рамках настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезокси nucleотида, если он присутствует в РНКи средстве, можно рассматривать как составляющее модифицированный нуклеотид.

В одном аспекте изобретения средство для применения в способах и композициях согласно изобретению представляет собой молекулу одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида, который ингибирует мРНК-мишень посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида комплементарна последовательности мРНК-мишени. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут стехиометрически ингибировать трансляцию за счет спаривания оснований с мРНК и физического блокирования механизма трансляции, см. Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355. Молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может иметь длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов и имеет последовательность, комплементарную последовательности-мишени. Например, молекула одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида может включать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше последовательных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена КГК оценивают по уменьшению количества мРНК КГК, которая может быть выделена или обнаружена в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген КГК, и которые подверглись или были обработаны таким образом, что экспрессия гена КГК была ингибирована по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которые не подвергались такой обработке (контрольные клетки). Степень ингибирования может быть выражена следующим образом:

$$\frac{(\text{мРНК в контрольных клетках}) - (\text{мРНК в обработанных клетках})}{(\text{мРНК в контрольных клетках})} \bullet 100\%$$

Фраза "контакт клетки с иРНК", такой как дцРНК, при использовании в настоящем документе включает контакт клетки, осуществляемый любым возможным способом. Контакт клетки с иРНК включает контакт клетки с иРНК *in vitro* или контакт клетки с иРНК *in vivo*. Контакт может осуществляться напрямую или непрямо. Таким образом, например, иРНК может быть приведена в физический контакт с клеткой лицом, выполняющим способ, или, в альтернативе, иРНК может быть помещена в ситуацию, которая обеспечит или вызовет ее последующий контакт с клеткой.

Контакт с клеткой *in vitro* может быть осуществлен, например, путем инкубирования клетки с иРНК. Контакт с клеткой *in vivo* может быть осуществлен, например, путем инъекции иРНК в ткань или рядом с тканью, где расположена клетка, или путем инъекции иРНК в другую область, например, в кровоток или подкожное пространство, в результате

чего средство впоследствии достигнет ткани, где находится клетка, которая пожелит контакту. Например, иРНК может содержать или может быть соединена с лигандом, например, GalNAc, который направляет иРНК в участок, представляющий интерес, например, в печень. Также возможны комбинации способов контакта *in vitro* и *in vivo*. Например, клетка также может быть подвергнута контакту *in vitro* с иРНК с последующей трансплантацией субъекту.

В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт клетки с иРНК включает "введение" или "доставку иРНК в клетку" путем облегчения или осуществления захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват иРНК может происходить посредством самостоятельной диффузии или активных клеточных процессов, или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение иРНК в клетку может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК можно вводить путем инъекции в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные методы описаны ниже или известны в уровне техники.

Термин "липидная наночастица" или "ЛНЧ" представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, иРНК или плазида, с которой транскрибируется иРНК. ЛНЧ описаны, например, в патентах США 6,858,225, 6,815,432, 8,158,601 и 8,058,069, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

При использовании в настоящем документе термин "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (например, человека, примата, не относящегося к человеку, например, обезьяну и шимпанзе), не примата (например, корову, свинью, лошадь, козу, кролика, овцу, хомяка, морскую свинку, кошку, собаку, крысу или мышь) или птицу, которое эндогенно или гетерологично экспрессирует ген-мишень. В одном варианте осуществления субъектом является человек, например, человек, который проходит лечение или оценку по поводу заболевания или нарушения, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК; человек с риском заболевания или нарушения, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК; человек, имеющий заболевание или нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК; или человек, который проходит лечение заболевания или нарушения, при котором может быть эффективным снижение экспрессии КГК, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъектом является женщина. В других вариантах осуществления субъектом является мужчина. В одном варианте осуществления субъект является взрослым субъектом. В другом варианте осуществления субъект является субъектом педиатрического профиля.

При использовании в настоящем документе термин "лечение" относится к полезному или требуемому результату, такому как уменьшение по меньшей мере одного проявления или симптома КГК-ассоциированного нарушения у субъекта. Лечение также

включает уменьшение одного или больше проявлений или симптомов, связанных с нежелательной экспрессией КГК; уменьшение степени нежелательной активации или стабилизации КГК; уменьшение тяжести или временное облегчение нежелательной активации или стабилизации КГК. "Лечение" также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин "более низкий" в контексте уровня КГК у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет по меньшей мере 20%. В некоторых вариантах осуществления снижение маркера заболевания, например, уровня экспрессии белка или гена, составляет по меньшей мере 50%. "Более низкий" в контексте уровня КГК у субъекта является снижением до уровня, принятого в качестве нормы для лица без такого нарушения. В некоторых вариантах осуществления экспрессия мишени нормализована, т.е. снижена до уровня или до уровня, принятого в качестве нормального для лица без такого нарушения, например, нормализация массы тела, артериального давления или уровня липидов в сыворотке. При использовании в настоящем документе термин "более низкий" у субъекта может относиться к снижению экспрессии гена или продукции белка в клетке у субъекта, не требующему снижения экспрессии во всех клетках или тканях субъекта. Например, при использовании в настоящем документе снижение у субъекта может включать снижение экспрессии генов или продукции белка в печени субъекта.

Термин "более низкий" также может использоваться применительно к нормализации симптома заболевания или состояния, т.е. уменьшению различия между уровнем у субъекта, страдающего КГК-ассоциированным заболеванием, по отношению к или до уровню у здорового субъекта, не страдающего КГК-ассоциированным заболеванием. Например, если субъект с нормальным весом 70 кг весит 90 кг до лечения (избыточный вес на 20 кг) и 80 кг после лечения (избыточный вес на 10 кг), вес субъекта снижается до нормального веса на 50% ($10/20 \times 100\%$). Аналогичным образом, если уровень ЛПВП у женщины повышается с 50 мг/дл (плохой) до 57 мг/дл при нормальном уровне 60 мг/дл, различие между предыдущим уровнем субъекта и нормальным уровнем уменьшается на 70% (различие в 10 мг/дл между уровнем субъекта и нормой уменьшается на 7 мг/дл, $7/10 \times 100\%$). При использовании в настоящем документе, если заболевание связано с повышенным значением симптома, "нормой" считается верхняя граница нормы. Если заболевание связано со сниженным значением симптома, "нормой" считается нижняя граница нормы.

При использовании в настоящем документе термин "профилактика" или "предупреждение", когда он используется в отношении заболевания, нарушения или состояния, при котором может быть эффективным снижение экспрессии гена КГК или продукции белка КГК, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, связанный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например,

признак или симптом экспрессии гена КГК или активности КГК и повышенного обмена фруктозы. Без ограничения каким-либо механизмом, известно, что катализируемое КГК фосфорилирование фруктозы с образованием фруктозо-1-фосфата, не регулируется ингибированием по принципу обратной связи, что может привести к истощению запасов АТФ и внутриклеточного фосфата, повышению уровня АМФ, что приводит к образованию мочевой кислоты. Кроме того, фруктозо-1-фосфат превращается в глицеральдегид, который вступает в цикл лимонной кислоты, увеличивая продукцию ацетил-КоА, стимулирующего синтез жирных кислот. Заболевания и патологические состояния, связанные с повышенным синтезом мочевой кислоты и жирных кислот, включают, например, заболевания печени (например, стеатоз печени, стеатогепатит, включая неалкогольный стеатогепатит (НАСГ)), дислипидемию (например, гиперлипидемию, повышенный уровень холестерина ЛПНП, пониженный уровень холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, не связанную с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистые заболевания (например, артериальную гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения в проксимальных канальцах, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, заболевание, связанное с отложением липидов или дисфункцией (например, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением), заболевание с повышением мочевой кислоты (например, гиперурикемию, подагру) и расстройства пищевого поведения, такие как чрезмерная тяга к сладкому. Отсутствие развития заболевания, нарушения или патологического состояния или уменьшение развития симптома или сопутствующей патологии, связанной с таким заболеванием, нарушением или патологическим состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически одобренной шкале для этого заболевания или нарушения), или проявление признаков или симптомов или прогрессирование заболевания, отсроченное на дни, недели, месяцы или годы, считается эффективной профилактикой.

При использовании в настоящем документе термин "ассоциированное с кетогексокиназой заболевание" или "КГК-ассоциированное заболевание" представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано или связано с экспрессией гена КГК или продукцией белка КГК. Термин "КГК-ассоциированное заболевание" включает заболевание, нарушение или состояние, при которых может быть эффективным снижение экспрессии гена КГК, репликации или активности белка КГК. Неограничивающие примеры КГК-ассоциированных заболеваний включают, например, заболевание печени (например, стеатоз печени, стеатогепатит, в том числе неалкогольный стеатогепатит (НАСГ)), дислипидемию (например, гиперлипидемию, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, не связанную с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистые заболевания (например, артериальную гипертензию, дисфункцию

эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения в проксимальных канальцах, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, заболевание, связанное с отложением липидов или дисфункцией (например, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением), заболевание, связанное с повышением мочевой кислоты (например, гиперурикемию, подагру), и расстройства пищевого поведения, такие как чрезмерная тяга к сладкому. Дополнительные подробности, касающиеся проявлений и симптомов различных заболеваний или состояний, представлены в настоящем документе и хорошо известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированное заболевание связано с повышением уровня мочевой кислоты (например, гиперурикемия, подагра).

В некоторых вариантах осуществления КГК-ассоциированное заболевание связано с повышенным уровнем липидов (например, стеатоз печени, стеатогепатит, в том числе неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), дислипидемия).

"Терапевтически эффективное количество" при использовании в настоящем документе включает количество РНКи средства, которое при введении субъекту, страдающему КГК-ассоциированным заболеванием, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, за счет уменьшения, облегчения или стабилизации существующего заболевания или одного или более симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может изменяться в зависимости от РНКи средства, способа введения средства, от заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического состава, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

"Профилактически эффективное количество" при использовании в настоящем документе включает количество РНКи средства, которое при введении субъекту, имеющему КГК-ассоциированное нарушение, является достаточным для предотвращения или облегчения заболевания или одного или больше симптомов заболевания. Облегчение заболевания включает замедление динамики заболевания или уменьшение тяжести развивающегося впоследствии заболевания. "Профилактически эффективное количество" может изменяться в зависимости от РНКи средства, способа введения средства, степени риска заболевания и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического состава, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество РНКи средства, которое оказывает некоторое желаемое действие при разумном соотношении пользы/риска, применимом к любому лечению. Применяемую в способах согласно настоящему изобретению иРНК могут вводить в количестве, достаточном для получения разумного соотношения пользы/риска, применимого к такому лечению.

Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций или лекарственных форм, которые, в рамках обоснованного врачебного мнения подходят для применения в контакте с тканями человека и животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель" при использовании в настоящем документе означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, технологическую добавку (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стериную кислоту), или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспорте рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и нетоксичным для субъекта, подвергаемого лечению. Такие носители известны в уровне техники. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения путем инъекции.

При использовании в настоящем документе термин "образец" включает набор подобных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из определенных органов, частей органов или жидкостей или клеток внутри этих органов. В некоторых вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, цельной печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" относится к моче, полученной от субъекта. "Образец, полученный от субъекта" может относиться к крови или сыворотке или плазме, полученной из крови субъекта.

II. Молекулы иРНК согласно изобретению

В настоящем изобретении предложены иРНКs, ингибирующие экспрессию гена кетогексокиназы. В некоторых вариантах осуществления иРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена КГК в клетке, такой как клетка у субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, подверженный риску развития нарушения, ассоциированного с кетогексокиназой. ДцРНКи средство включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна, по меньшей мере, части мРНК, образующейся при экспрессии гена КГК. Область комплементарности имеет длину приблизительно 19-30 нуклеотидов (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 или 19 нуклеотидов). При контакте с

клеткой, экспрессирующей ген КГК, иРНК ингибирует экспрессию гена КГК (например, гена КГК человека, примата, неprimата или крысы) по меньшей мере приблизительно на 50%, при анализе, например, с помощью метода на основе ПЦР или гибридизации разветвленной ДНК (рДНК), или метода на основе белка, такого как иммунофлуоресцентный анализ, с использованием, например, методов Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии определяют с помощью метода кПЦР, представленного в настоящих примерах, с миРНК, например, в концентрации 10 нМ, в подходящей линии клеток организма, представленной там. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяют при нокдауне человеческого гена у грызунов, экспрессирующих человеческий ген, например, у мыши или ААВ-инфицированной мыши, экспрессирующей человеческий ген-мишень, например, при введении в виде однократной дозы, например, в дозе 3 мг/кг на пиковой экспрессии РНК.

ДцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых будет использоваться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна, а обычно полностью комплементарна последовательности-мишени. Последовательность-мишень может быть получена из последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена КГК. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, комплементарную антисмысловой цепи, причем две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другой части настоящего документа, и как известно в уровне техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не в виде отдельных олигонуклеотидов.

Как правило, дуплексная структура имеет длину 15-30 пар оснований, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления дуплексная структура имеет длину 18-25 пар оснований, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований, например, 19-21 пару оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются в качестве части изобретения.

Аналогичным образом, область комплементарности с последовательностью-мишенью имеет длину 15-30 нуклеотидов, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-

22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, например, 19-23 нуклеотида или 21-23 нуклеотида. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются в качестве части изобретения.

В некоторых вариантах осуществления дуплексная структура имеет длину 19-30 пар оснований. Аналогичным образом, область комплементарности с последовательностью-мишенью имеет длину 19-30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов или приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, дцРНК достаточно длинна, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, из уровня техники хорошо известно, что дцРНК длиной более 21-23 нуклеотидов могут служить в качестве субстратов для Dicer. Как также известно специалисту в данной области, область РНК, служащая в качестве мишени при расщеплении, чаще всего является частью более крупной молекулы РНК, обычно молекулы мРНК. В соответствующих случаях "часть" мРНК-мишени представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени достаточной длины, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т.е. расщепления по пути RISC).

Специалисту в данной области также известно, что дуплексная область является основной функциональной частью дцРНК, например, дуплексной областью длиной от приблизительно 19 до приблизительно 30 пар оснований, например, приблизительно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления, до такой степени, что она процессируется с образованием функционального дуплекса, например, длиной 15-30 пар оснований, который направленно взаимодействует с нужной РНК при расщеплении, молекула РНК или комплекс молекул РНК, содержащая дуплексную область длиной больше 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, среднему специалисту в данной области известно, что в одном варианте осуществления миРНК представляет собой дцРНК. В другом варианте осуществления дцРНК не является природной миРНК. В другом варианте осуществления иРНК средство, применяемое для направленного воздействия на экспрессию гена кетогексокиназы, не образуется в клетке-мишени в результате расщепления более крупной дцРНК.

ДцРНК, как описано в настоящем документе, может дополнительно включать один или больше одноцепочечных нуклеотидных оверхенгов, например, из 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. Молекулы дцРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный оверхенг, могут обладать превосходящими ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами, имеющими тупые концы. Нуклеотидный оверхенг может включать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Оверхенг(и) может присутствовать на смысловой цепи, антисмысловой цепи или их любой комбинации.

Кроме того, нуклеотид(ы) оверхенга может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой цепи или смысловой цепи дцРНК.

ДцРНК может быть синтезирована стандартными методами, известными в уровне техники. Двухцепочечные соединения РНК согласно изобретению могут быть получены с помощью двухстадийной процедуры. Сначала отдельно получают индивидуальные цепи молекулы двухцепочечной РНК. Затем составляющие цепи отжигаются. Индивидуальные цепи соединения миРНК могут быть получены с помощью жидкофазного и/или твердофазного органического синтеза. Органический синтез обеспечивает преимущество легкого получения олигонуклеотидных цепей, включающих неприродные или модифицированные нуклеотиды. Аналогичным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть получены с помощью жидкофазного и/или твердофазного органического синтеза.

Соединения иРНК согласно изобретению могут быть получены с помощью двухстадийной процедуры. Сначала отдельно получают индивидуальные цепи двухцепочечной молекулы РНК. Затем составляющие цепи отжигаются. Индивидуальные цепи соединения миРНК могут быть получены с помощью жидкофазного и/или твердофазного органического синтеза. Органический синтез обеспечивает преимущество легкого получения олигонуклеотидных цепей, включающих неприродные или модифицированные нуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть получены с помощью жидкофазного и/или твердофазного органического синтеза.

МиРНК может быть получена, например, в крупном масштабе, множеством способов. Примеры способов включают: органический синтез и расщепление РНК, например, расщепление *in vitro*.

МиРНК может быть получена путем отдельного синтеза одноцепочечной молекулы РНК или каждой соответствующей цепи молекулы двухцепочечной РНК, после чего составляющие цепи могут затем отжигаться.

Большой биореактор, например, OligoPilot II производства Pharmacia Biotec AB (Uppsala Sweden), можно использовать для получения большого количества конкретной цепи РНК для данной миРНК. Реактор OligoPilotII может эффективно связывать нуклеотид при использовании только 1,5-молярного избытка фосфорамидитного нуклеотида. Для получения цепи РНК используются амидиты рибонуклеотидов. Стандартные циклы добавления мономера могут использоваться для синтеза цепи из 21-23 нуклеотидов для миРНК. Как правило, две комплементарные цепи получают отдельно, а затем отжигают, например, после высвобождения с твердой подложки и удаления защиты.

Органический синтез можно использовать для получения отдельных молекул миРНК. Комплементарность такой молекулы к гену КГК может быть точно определена. Например, такие молекулы могут быть комплементарны области, которая включает полиморфизм, например, одонуклеотидный полиморфизм. Кроме того, может быть точно определено положение полиморфизма. В некоторых вариантах осуществления

полиморфизм расположен во внутренней области, например, по меньшей мере, в 4, 5, 7 или 9 нуклеотидах от одного или обоих концов.

В одном варианте осуществления получаемую РНК тщательно очищают для удаления концов, и иРНК расщепляют *in vitro* на миРНК, например, при использовании Dicer или подобной активности на основе РНКазы III. Например, дцРНК можно инкубировать в экстракте из дрозофилы *in vitro* или с использованием очищенных компонентов, например, очищенной РНКазы или комплекса RISC (РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга). См., например, Ketting et al. *Genes Dev* 2001, 15 Oct, 15(20):2654-9 и Hammond Science, 2001, 10 Aug, 293(5532):1146-50.

Расщепление дцРНК обычно дает множество видов миРНК, каждый из которых представляет собой конкретный фрагмент длиной от 21 до 23 нуклеотидов из исходной молекулы дцРНК. Например, могут присутствовать миРНК, которые включают последовательности, комплементарные перекрывающимся областям и соседним областям исходной молекулы дцРНК.

Независимо от способа синтеза препарат миРНК может быть приготовлен в растворе (например, водном и/или органическом растворе), который подходит для изготовления состава. Например, препарат миРНК может быть осажден и повторно растворен в чистой бидистиллированной воде и лиофилизирован. Затем высушенная миРНК может быть ресуспендирована в растворе, подходящем для предполагаемого процесса изготовления состава.

В одном аспекте дцРНК согласно изобретению включает по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая цепь выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-5, а соответствующая антисмысловая цепь смысловой цепи выбрана из группы последовательностей в любой из Таблиц 2-5. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена кетогексокиназы. Таким образом, в данном аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь в любой из Таблиц 2-5, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5.

В некоторых вариантах осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В других вариантах осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-252498.1, AD-252339.1, AD-252285.1, AD-252531.1, AD-254265.1, AD-254403.1, AD-252627.1, AD-252146.1, AD-252666.1 и AD-252379.1.

Следует понимать, что хотя последовательности в Таблицах 2 и 4 не описаны как

модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК иРНК согласно изобретению, например дцРНК согласно изобретению, может включать любую из последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-5, которая не модифицирована, не конъюгирована или модифицирована или конъюгирована иначе, чем описано там. Другими словами, изобретение охватывает дцРНК в Таблицах 2-5, которые не модифицированы, не конъюгированы, модифицированы или конъюгированы, как описано в настоящем документе.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру приблизительно из 20-23 пар оснований, например 21 пары оснований, считаются особенно эффективными при индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Однако другие исследователи обнаружили, что эффективными также могут быть более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В вариантах осуществления, представленных выше, в силу природы последовательностей олигонуклеотидов, представленных в любой из Таблиц 2-5, описанные в настоящем документе дцРНК могут включать по меньшей мере одну цепь длиной не меньше 21 нуклеотида. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие любую из последовательностей в любой из Таблиц 2-5, за исключением нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут обладать аналогичной эффективностью при сравнении с дцРНК, описанными выше. Следовательно, дцРНК, имеющие последовательность по меньшей мере из 19, 20 или больше последовательных нуклеотидов, взятых из любой из последовательностей в любой из Таблиц 2-5 и отличающихся по своей способности ингибировать экспрессию гена кетогексокиназы не больше чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования при использовании дцРНК, включающей полную последовательность, включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, представленные в Таблицах 2-5, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте кетогексокиназы, который чувствителен к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно предложены иРНК, которые направлены на один из этих сайтов. При использовании в настоящем документе утверждается, что иРНК направлена на конкретный сайт РНК-транскрипта, если иРНК вызывает расщепление транскрипта в каком-либо положении этого конкретного сайта. Такая иРНК обычно будет включать по меньшей мере приблизительно 19 последовательных нуклеотидов из любой из последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-5, которые связаны с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, прилегающей к выбранной последовательности в гене кетогексокиназы.

Средство РНКи, описанное в настоящем документе, может содержать один или больше некомплементарных нуклеотидов по отношению к последовательности-мишени. В одном варианте осуществления средство РНКи, описанное в настоящем документе, содержит не больше 3 некомплементарных нуклеотидов (т.е. 3, 2, 1 или 0

некомплементарных нуклеотидов). В одном варианте осуществления средство РНКи, описанное в настоящем документе, содержит не более 2 некомплементарных нуклеотидов. В одном варианте осуществления средство РНКи, описанное в настоящем документе, содержит не больше 1 некомплементарного нуклеотида. В одном варианте осуществления средство РНКи, описанное в настоящем документе, содержит 0 некомплементарных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь средства РНКи содержит нуклеотиды, некомплементарные последовательности-мишени, такой некомплементарный нуклеотид необязательно может находиться в пределах последних 5 нуклеотидов с 5'- или с 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления, для средства РНКи из 23 нуклеотидов, цепь, комплементарная области гена КГК, обычно не содержит какой-либо некомплементарный нуклеотид в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в уровне техники, могут применяться для определения, эффективно ли средство РНКи, содержащее нуклеотид, некомплементарный последовательности-мишени, для ингибирования экспрессии гена КГК. Оценка эффективности средств РНКи с некомплементарными нуклеотидами при ингибировании экспрессии гена КГК важна, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене КГК имеет полиморфную вариацию последовательности в пределах популяции.

III. Модифицированные иРНК согласно изобретению

В некоторых вариантах осуществления РНК в иРНК согласно изобретению, например дцРНК, не модифицирована и не включает, например, химические модификации или конъюгирования, известные в уровне техники и описанные в настоящем документе. В других вариантах осуществления РНК в иРНК согласно изобретению, например дцРНК, химически модифицирована с целью улучшения стабильности или других полезных свойств. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированы по существу все нуклеотиды иРНК согласно изобретению. В других вариантах осуществления изобретения модифицированы все нуклеотиды иРНК или по существу все нуклеотиды иРНК, т.е. в цепи иРНК присутствует не больше 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, показанные в изобретении, могут быть синтезированы или модифицированы способами, хорошо известными в данной области, такими как способы, описанные в справочнике "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен в настоящий документ посредством отсылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или 3'-концевые модификации (конъюгирование, ДНК нуклеотиды, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (абазические нуклеотиды) или конъюгированные основания; модификации сахара

(например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации скелета, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений иРНК, применяемых в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, без ограничения этим, молекулы РНК, содержащие модифицированные скелеты или не содержащие природных межнуклеозидных связей. Молекулы РНК с модифицированным скелетом включают, среди прочего, РНК, которые не содержат атом фосфора в скелете. В рамках настоящего описания, и как иногда указывают в уровне техники, модифицированные РНК, которые не имеют атом фосфора в своем межнуклеозидном скелете, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном скелете.

Модифицированные скелеты РНК включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат, и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие обычные 3'-5' связи, их аналоги с 2'-5'-связями, а также соединения с инвертированной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения дцРНК средства согласно изобретению находятся в форме свободной кислоты. В других вариантах осуществления изобретения дцРНК средства согласно изобретению находятся в форме соли. В одном варианте осуществления дцРНК средства согласно изобретению находятся в форме натриевой соли. В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК средства согласно изобретению находятся в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в средстве в качестве противоионов по существу всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных групп, присутствующих в средстве. Средства, в которых по существу все фосфодиэфирные и/или фосфоротиоатные связи имеют противоион натрия, включают не больше 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирную и/или фосфоротиоатную связь без противоиона натрия. В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК средства согласно изобретению находятся в форме натриевой соли, ионы натрия присутствуют в средстве в качестве противоионов всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных групп, присутствующих в средстве.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных фосфорсодержащих соединений, включают, без ограничения перечисленными, патенты США 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715;

6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

Скелеты модифицированных РНК, которые не включают атом фосфора, образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или больше короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся скелеты, имеющие морфолиновые связи (образованные частично из остатка сахара нуклеозида); силоксановые скелеты; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые скелеты; формацетильные и тиоформацетильные скелеты; метиленформацетильные и тиоформацетильные скелеты; алкенсодержащие скелеты; сульфаматные скелеты; метиленимино и метиленигидразино-скелеты; сульфонатные и сульфаниламидные скелеты; амидные скелеты; и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, без ограничения перечисленными, патенты США, 034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; и 5,677,439, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

Для применения в иРНК, предложенных в настоящем документе, предусмотрены подходящие РНК-миметики, в которых и сахар, и межнуклеозидная связь, то есть скелет, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Основания сохраняются для гибридизации с соответствующим соединением нуклеиновой кислоты-мишени. Одно такое олигомерное соединение, в котором РНК-миметик, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидо-нуклеиновой кислотой (ПНК). В соединениях ПНК сахарный скелет РНК заменен амидсодержащим скелетом, в частности, аминоксилотным скелетом. Нуклеиновые основания сохраняются и связаны напрямую или непрямо с атомами азота азатопов амидной части скелета. Репрезентативные патенты США, в которых описано получение соединений ПНК, включают, без ограничения перечисленными, патенты США 5,539,082; 5,714,331 и 5,719,262, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством отсылки. Дополнительные соединения ПНК, подходящие для применения в иРНК согласно изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными скелетами и олигонуклеозиды с гетероатомными скелетами, и, в частности, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [известный как метилен (метилямино) или MMI скелет], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- и -N(CH₃)-CH₂-CH₂- из

вышеуказанного патента США 5,489,677, и амидные скелеты из вышеуказанного патента США 5,602,240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в настоящем документе, имеют структуры с морфолино-скелетом из вышеуказанного патента США 5,034,506. Нативный фосфодиэфирный скелет может быть представлен как $O-P(O)(OH)-OCH_2-$.

Модифицированные РНК также могут содержать один или больше замещенных сахарных остатков. Средства РНКи, например, дцРНК, представленные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в 2'-положении: OH ; F ; $O-$, $S-$ или N -алкил; $O-$, $S-$ или N -алкенил; $O-$, $S-$ или N -алкинил; или O -алкил- O -алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенным или незамещенным C_1-C_{10} алкилом или C_2-C_{10} алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равны от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления дцРНК включают одно из следующего в 2'-положении: C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O -алкарил или O -аралкил, SH , SCH_3 , OCN , Cl , Br , CN , CF_3 , OCF_3 , $SOCH_3$, SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокалиламино, полиалкаламино, замещенный силил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств РНКи средства или группу для улучшения фармакодинамических свойств РНКи средства, а также другие заместители, обладающие подобными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'- $O-CH_2CH_2OCH_3$, также известный как 2'- O -(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкокси, группу. Другим примером модификации является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известный в уровне техники как 2'- O -диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'- $O-CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$. Другие иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды, (R и S изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N -метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'- OCH_3), 2'-аминопропокси (2'- $OCH_2CH_2CH_2NH_2$) и 2'-фтор (2'- F). Подобные модификации также могут быть сделаны в других положениях на РНК иРНК, в частности 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5' связанных дцРНК и 5'-положении 5'-концевом нуклеотиде. Также иРНК может содержать миметики сахара, такие как циклобутильные группы вместо пентофуранозильного сахара. Репрезентативные патенты США, в которых описана подготовка таких модифицированных сахарных структур, включают, без ограничения перечисленными, патенты США 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; и 5,700,920, некоторые из которых находятся в общем владении с настоящей заявкой. Все содержание каждого из

предыдущих патентов включено в настоящий документ посредством отсылки.

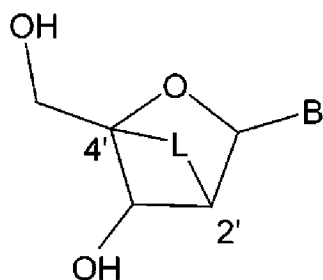
Также иРНК может включать модификации или замены нуклеинового основания (часто именуемое в уровне техники просто "основанием"). При использовании в настоящем документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимидин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галогены, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-даазааденин и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Другие нуклеиновые основания включают основания, раскрытые в патенте США 3,687,808, раскрытые в публикации *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в публикации *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и раскрытые в публикации *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно полезны для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозином повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (*Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278*) и являются типичными заменами оснований, особенно в сочетании с 2'-О-метоксиэтил модификациями сахара.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, без ограничения, вышеуказанные патенты США 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; и 7,495,088, все содержание каждого из которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

Средство РНКи согласно изобретению может быть также модифицировано путем

включения одного или больше остатков бициклического сахара. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное кольцом, образованным в результате соединения мостиком двух атомов углерода, соседних или не соседних атомов. "Бициклический нуклеозид" ("БНК") представляет собой нуклеозид, содержащий остаток сахара, включающий кольцо, полученное в результате образования мостика, включая мостик, соединяющий два атома углерода, соседних или не соседних, два атома углерода в кольце сахара, с образованием бициклической кольцевой системы. В некоторых вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца, необязательно через 2'-ациклический атом кислорода. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство согласно настоящему изобретению может включать одну или больше замкнутых нуклеиновых кислот (ЗНК). Замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный остаток рибозы, который содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Другими словами, ЗНК представляет собой нуклеотид, содержащий остаток бициклического сахара, включающий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно "замыкает" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление замкнутых нуклеиновых кислот в миРНК повышает стабильность миРНК в сыворотке и снижает побочные эффекты (Elmen, J. et al., (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook OR et al., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843, Grunweller A. et al., (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, включающие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные средства согласно настоящему изобретению включают один или больше бициклических нуклеозидов, включающих 4'-2' мостик.

Замкнутый нуклеозид может быть представлен следующей структурой (не включающей стереохимию):



где В является нуклеиновым основанием или модифицированным нуклеиновым основанием, а L является соединяющей группой, которая соединяет 2'-углерод с 4'-углеродом в кольце рибозы.

Примеры таких 4'-2'-мостиковых бициклических нуклеозидов включают, без ограничения, 4'-(CH₂)-O-2' (ЛНК); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ЭНК); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый "затрудненный этил" или "сEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США 8,278,283); 4'-CH₂-N (OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США

8,278,425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, патентную публикацию США 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12 алкил или защитную группу азота (см., например, патент США 7,427,672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США 8,278,426). Все содержание каждого из предыдущих документов включено в настоящий документ посредством отсылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и патентные публикации США, в которых описано получение нуклеотидов замкнутой нуклеиновой кислоты, включают, без ограничения, следующие: патенты США 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, все содержание каждого из которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

Любой из указанных выше бициклических нуклеозидов может быть получен с одной или более стереохимическими конфигурациями сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНКи средство согласно изобретению также может быть модифицировано путем включения одного или больше затрудненных этилнуклеотидов. При использовании в настоящем документе термин "затрудненный этилнуклеотид" или "сEt" представляет собой замкнутую нуклеиновую кислоту, включающую остаток бициклического сахара, включающий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2' (т.е. L в предыдущей структуре). В одном варианте осуществления затрудненный этилнуклеотид находится в S-конформации, именуемой в настоящем документе "S-cEt".

Также иРНК согласно изобретению может включать один или больше "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4' атомы углерода рибозы или КГК и -C5' атомы углерода рибозы. CRN замыкает кольцо рибозы в стабильной конформации и увеличивает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину, чтобы кислород располагался в оптимальном положении для стабильности и аффинности, что приводит к уменьшению неплоского колебания кольца рибозы.

Репрезентативные публикации, в которых описано получение некоторых из указанных выше CRN, включают, без ограничения перечисленными, патентную публикацию США 2013/0190383; и публикацию РСТ WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

В некоторых вариантах осуществления иРНК согласно изобретению включает один или более мономеров, которые представляют собой UNA нуклеотиды (разомкнутая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой разомкнутую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием разомкнутого "сахарного" остатка. В одном примере UNA также включает мономер с удалением связей между C1'-C4' (т.е. ковалентной связи углерод-кислород-углерод между атомами углерода

C1' и C4'). В другом примере была удалена связь C2'-КГК' (т.е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и КГК') сахара (см. Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, включенные в настоящий документ посредством отсылки).

Репрезентативные публикации США, в которых описано получение UNA, включают, без ограничения, патент США 8,314,227; и патентные публикации США 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

Потенциально стабилизирующие концевые модификации молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур -С6-амино), 2-докозаноил-уридин-3'-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и пр. Описание этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

Другие модификации нуклеотидов иРНК изобретения включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой цепи иРНК. Подходящие миметики фосфата описаны, например, в патентной публикации США 2012/0157511, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки.

А. Модифицированные иРНК, включающие мотивы согласно изобретению

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные РНК средства согласно изобретению включают средства с химическими модификациями, как раскрыто, например, в WO 2013/075035, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки. В WO 2013/075035 предложены мотивы из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, которые могут быть введены в смысловую цепь или антисмысловую цепь дцРНКи средства, в частности, в сайт расщепления или около него. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНКи средства могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает профиль модификации, если таковой присутствует, смысловой или антисмысловой цепи. ДцРНКи средство может быть необязательно конъюгировано с лигандом производным GalNAc, например, на смысловой цепи.

В частности, когда смысловая цепь и антисмысловая цепь двухцепочечного РНК средства полностью модифицированы путем включения одного или больше мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или около него, по меньшей мере на одной цепи дцРНКи средства.

Таким образом, в изобретении предложены двухцепочечное РНК средство, способное к ингибированию экспрессии гена-мишени (т.е. гена КГК) *in vivo*. РНКи средство включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь РНКи средства может иметь длину, например, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют дуплексную двухцепочечную РНК ("дцРНК"), также именуемую в настоящем документе как "дцРНКи средство". Дуплексная область дцРНКи средства может быть, например, дуплексной областью, которая может иметь длину 27-30 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере длина дуплексной области выбрана из 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство может содержать одну или больше концевых выступающих одноцепочечных областей (оверхенгов) или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих цепей. Оверхенг может независимо иметь длину 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления области оверхенгов могут включать удлиненные области оверхенгов, как предусмотрено выше. Оверхенги могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом расположения двух цепей одинаковой длины со смещением друг относительно друга. Оверхенг может образовывать некомплементарный нуклеотид с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарным последовательности гена-мишени, или может быть другой последовательностью. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например дополнительными основаниями, с образованием шпильки или другими линкерами, не содержащими оснований.

В некоторых вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в выступающей концевой области РНКи средства может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включающий, без ограничения, модифицированный 2'-сахар, такой как 2-F, 2'-О-метил, тимидин (Т) 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5 метилцитидин (m5Сео) и их любые комбинации.

Например, ТТ может представлять собой выступающую концевую последовательность на любом конце любой цепи. Оверхенг может образовывать некомплементарный нуклеотид с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарен последовательности гена-мишени, или может быть другой последовательностью.

5'- или 3'-оверхенги на смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях дцРНКи средства могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающая область(и) содержит два нуклеотида, содержащих фосфоротиоат между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В некоторых вариантах осуществления такой 3'-оверхенг присутствует в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-оверхенг присутствует в смысловой цепи.

ДцРНКи средство может содержать только один оверхенг, что может усиливать интерференционную активность РНКи, не влияя на ее общую стабильность. Например,

одноцепочечный оверхенг может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, в альтернативе, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конце смысловой цепи), или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь дцРНКи средства имеет нуклеотидный оверхенг на 3'-конце, при этом 5'-конец - тупой. Без ограничения теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и выступающий 3'-конец антисмысловой цепи способствуют включению направляющей цепи в процесс RISC.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство имеет два тупых конца и длину 19 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В других вариантах осуществления дцРНКи средство имеет два тупых конца и длину 20 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления дцРНКи средство имеет два тупых конца и длину 21 нуклеотид, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, при этом один конец РНКи средства - тупой, а другой конец содержит 2 выступающих нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления оверхенг из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Когда оверхенг из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, идущий после выступающего нуклеотида. В одном варианте осуществления РНКи средство дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи дцРНКи средства, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах

осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно дцРНКи средство дополнительно включает лиганд (такой как GalNAc).

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, где, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения с 1 по 23 первой цепи включают по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, включает по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где, по меньшей мере, 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, образуя в результате 3'-концевой оверхенг из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, образуя в результате 10-30 нуклеотидный одноцепочечный 5'-оверхенг; где, по меньшей мере, 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены с максимальной комплементарностью, образуя, таким образом, по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь обладает достаточной комплементарностью РНК-мишени на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи, чтобы экспрессия гена-мишени снижалась при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает смысловую и антисмысловую цепи, где дцРНКи средство включает первую цепь длиной по меньшей мере 25 и не больше 29 нуклеотидов и вторую цепь длиной не больше 30 нуклеотидов по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь на 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее первой цепи, где дуплексная область, которая имеет длину по меньшей мере 25 нуклеотидов, и вторая цепь являются достаточно комплементарными мРНК-мишени на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов второй цепи для снижения экспрессии гена-мишени при введении РНКи средства в клетку млекопитающего, и где расщепление Dicer РНКи средства предпочтительно дает миРНК, включающую 3'-конец второй цепи, снижая, таким образом, экспрессию гена-мишени у млекопитающего. Необязательно РНКи средство дополнительно включает лиганд.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНКи средства содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНКи средства может также содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

В случае дцРНКи средства, имеющего дуплексную область длиной 19-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы трех одинаковых модификаций могут присутствовать в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14 или положениях 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при отсчете начиная с первого нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи или отсчете начиная с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в зависимости от длины дуплексной области дцРНКи средства от 5'-конца.

Смысловая цепь дцРНКи средства может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеют по меньшей мере один перекрывающийся нуклеотид, то есть по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. В альтернативе могут перекрываться по меньшей мере два нуклеотида или могут перекрываться все три нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНКи средства может содержать больше одного мотива из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может присутствовать в сайте расщепления цепи или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланговой модификацией. Термин "фланговая модификация" в настоящем документе относится к мотиву, находящемуся в другой части цепи, который отделен от мотива в сайте или рядом с сайтом расщепления той же цепи. Фланговая модификация либо граничит с первым мотивом, либо отделена от него по меньшей мере одним или более нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно примыкают друг к другу, то тогда химия мотивов отличается, а когда мотивы разделены одним или более нуклеотидами, химия мотивов может быть такой же или другой. Могут присутствовать две или больше фланговых модификаций. Например, если присутствуют две фланговых модификации, каждая фланговая модификация может присутствовать на

одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте или рядом с сайтом расщепления, или с любой стороны от основного мотива.

Как и смысловая цепь, антисмысловая цепь дцРНКи средства может содержать больше одного мотива из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте или рядом с сайтом расщепления цепи. Такая антисмысловая цепь также может содержать одну или больше выровненных фланговых модификаций, аналогично фланговым модификациям, которые могут присутствовать на смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления фланговая модификация смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНКи средства обычно не включает первые один или два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

В других вариантах фланговая модификация на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНКи средства обычно не включает первые один или два спаренных нуклеотида в дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНКи средства содержат по меньшей мере одну фланговую модификацию, фланговые модификации могут находиться на одном и том же конце дуплексной области и могут иметь один, два или три перекрывающихся нуклеотида.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНКи средства содержат по меньшей мере две фланговых модификации, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что две модификации, по одной на каждой цепи, попадают на один конец дуплексной области, имеющей один, два или три перекрывающихся нуклеотида; две модификации, по одной на каждой цепи, попадают на другой конец дуплексной области, имеющей один, два или три перекрывающихся нуклеотида; две модификации, по одной на цепи, попадают на каждую сторону основного мотива, имеющего один, два или три перекрывающихся нуклеотида в дуплексной области.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой и антисмысловой цепях дцРНК средства, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одной и той же или другой модификацией, которая может включать одно или больше изменений одного или обоих несвязывающих атомов кислорода фосфата или одного или больше связывающих атомов кислорода фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила рибозного сахара; полную замену фосфатной группы "дефосфо" линкерами; модификацию или замену природного основания; и замену или модификацию рибозо-фосфатного скелета.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры, состоящие из субъединиц, многие из модификаций присутствуют в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания или фосфатной группы, или несвязывающего атома О фосфатной группы. В некоторых случаях модификация будет присутствовать во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих

случаях она не присутствует. Например, модификация может присутствовать только в 3'- или 5'-концевом положении, может присутствовать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может присутствовать в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих этих областях. Модификация может присутствовать только в двухцепочечной области РНК или может присутствовать только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в положении несвязывающего О может присутствовать только на одном или обоих концах, может присутствовать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах в цепи, или может присутствовать в двухцепочечных и одноцепочечных областях, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Можно, например, повысить стабильность, включить конкретные основания в оверхенги или включить модифицированные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов в одноцепочечные оверхенги, например, в 5'- и/или 3'-оверхенг. Например, может быть желательным включить в оверхенги пуриновые нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-оверхенге могут быть модифицированы, например, модификацией, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области, например, использование дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксигидрокси-2'-фтор (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов вместо рибосахара нуклеинового основания, и модификаций в фосфатной группе, например, фосфоротиоатных модификаций. Оверхенги не должны обязательно гомологичными с целевой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован ЛНК, HNA, CRN, cET, UNA, гликольнуклеиновой кислотой (GNA), гекситнуклеиновой кислотой, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксигидрокси, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Цепи могут содержать больше одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

На смысловой и антисмысловой цепях, как правило, присутствуют по меньшей мере две разные модификации. Эти две модификации могут быть 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями, ациклическими нуклеотидами или другими.

В некоторых вариантах осуществления N_a и N_b включают модификации в чередующемся порядке. Термин "чередующийся мотив" при использовании в настоящем документе относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, причем каждая модификация присутствует на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждые два нуклеотида или по одному на каждые три нуклеотида, или к аналогичному порядку. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может быть

"АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...",
"АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся порядок, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловых или антисмысловых цепей может быть выбрана из нескольких возможностей модификаций в чередующемся порядке, таких как "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство согласно изобретению включает порядок модификации чередующегося мотива на смысловой цепи по сравнению с порядком модификации чередующегося мотива на антисмысловой цепи. Смещение может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует модифицированной по-разному группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, когда смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью в дцРНК дуплексе, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "АВАВАВ" с 5' к 3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВАВАВА" с 5' к 3' цепи в дуплексной области. В качестве еще одного примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "ААВВААВВ" с 5' к 3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВВААВВАА" с 5' к 3' цепи в дуплексной области, при этом происходит полное или частичное смещение порядков модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает порядок чередующегося мотива 2'-О-метил модификации и 2'-F модификации в смысловой цепи, который первоначально смещен относительно порядка чередующегося мотива 2'-О-метил модификации и 2'-F модификации в антисмысловой цепи изначально, т.е. 2'-О-метил модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловой цепи с 2'-F модифицированным нуклеотидом на антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F модификации, а положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метил модификации.

Введение одного или больше мотивов трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую цепь или антисмысловую цепь прерывает исходный профиль модификаций, присутствующий в смысловой цепи или антисмысловой цепи. Такое прерывание профиля модификаций смысловой или антисмысловой цепи путем введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую или антисмысловую цепь может усиливать активность сайленсинга гена в отношении гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида, следующего после мотива, представляет собой модификацию, которая отличается от модификации в мотиве. Например, часть последовательности, содержащая

мотив, представляет собой "...N_aYYYN_b...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, а "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего после мотива "YYY", который отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут быть одинаковыми или разными модификациями. В альтернативе, N_a или N_b могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланкирующая модификация.

иРНК может дополнительно включать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может присутствовать на любом нуклеотиде смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может присутствовать на каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может присутствовать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь может содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся порядке. Порядок чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть таким же или может отличаться от антисмысловой цепи, и порядок чередования модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть смещен относительно порядка чередования модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления двухцепочечное средство РНКи включает 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает две фосфоротиоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце и две фосфоротиоатных межнуклеотидных связи на 3'-конце, и смысловая цепь включает по меньшей мере две фосфоротиоатных межнуклеотидных связи или на 5'-конце или на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в области оверхенга. Например, область оверхенга может содержать два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть сделаны для соединения нуклеотидов в оверхенге с концевыми парами нуклеотидов в дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды в оверхенге могут быть связаны фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью, и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид в оверхенге со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидом в оверхенге. Например, по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут присутствовать между тремя концевыми нуклеотидами, два из которых находятся в оверхенге, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с нуклеотидом в оверхенге. Эти три концевых нуклеотида могут присутствовать на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой

цепи, 5'-конце антисмысловой цепи или 5'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления 2-нуклеотидный оверхенг находится на 3'-конце антисмысловой цепи, при этом между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, расположенный после выступающего нуклеотида. Необязательно дцРНКи средство может дополнительно содержать две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство согласно изобретению включает некомплементарный мишени нуклеотид(ы) в пределах дуплекса или их комбинации. Некомплементарный нуклеотид может присутствовать в области оверхенга или области дуплекса. Пара оснований может быть ранжирована по своей склонности вызывать диссоциацию или плавление (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары; наиболее простой подход состоит в проверке пар на индивидуальной основе, хотя также может использоваться анализ следующего соседа или аналогичный анализ). С точки зрения стимуляции диссоциации: A:U предпочтительнее G:C; G:U предпочтительнее G:C; и I:C предпочтительнее G:C (I=инозин). Некомплементарные нуклеотиды, например, неканонические или отличные от канонических пары (как описано в другой части настоящего документа), предпочтительнее канонических (A:T, A:U, G:C) пар; и пары, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических пар.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство включает по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, которые независимо выбраны из группы: A:U, G:U, I:C, и некомплементарные пары, например, неканонические или отличные от канонических пары, или пары, которые включают универсальное основание, что способствует диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи выбран из A, dA, dU, U и dT. В альтернативе по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

В других вариантах осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT), или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Например, существует короткая последовательность дезокситимидиновых нуклеотидов, например двух нуклеотидов dT, на 3'-конце смысловой, антисмысловой цепи или обеих цепей.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи может

быть представлена формулой (I):



в которой:

каждое i и j независимо равно 0 или 1;

каждое p и q независимо равно 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид в выступающем конце;

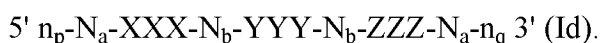
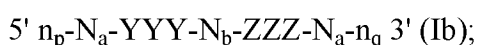
где N_b и Y не имеют одну и ту же модификацию; и

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

В некоторых вариантах осуществления N_a или N_b включает модификации чередующегося профиля.

В некоторых вариантах осуществления мотив YYY присутствует в сайте или рядом с сайтом расщепления смысловой цепи. Например, когда дцРНКи средство имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотидов, мотив YYY может присутствовать в сайте или рядом с сайтом расщепления (например: может присутствовать в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, при отсчете начиная с первого нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно, при отсчете начиная с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца.

В одном варианте осуществления i равно 1, а j равно 0, или i равно 0, а j равно 1, или i и j равны 1. Смысловая цепь может быть, таким образом, представлена следующими формулами:



Если смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

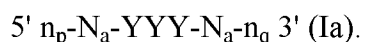
Когда смысловая цепь представлен в виде формулы (Ic), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10

модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлен в виде формулы (Id), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления N_b равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

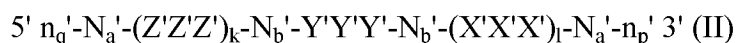
Каждый из X, Y и Z может быть одним и тем же или отличаться друг от друга.

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



Если смысловая цепь представлена формулой (Ia), каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):



в которой:

каждое k и l независимо равно 0 или 1;

каждое p' и q' независимо равно 0-6;

каждый N'_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N'_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n'_p и n'_q независимо представляет собой нуклеотид в выступающем конце;

где N'_b и Y' не имеют одну и ту же модификацию;

и

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

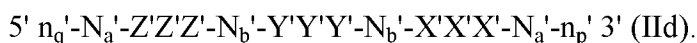
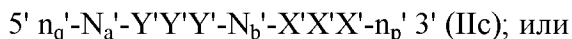
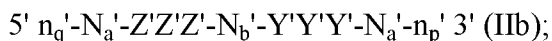
В некоторых вариантах осуществления N'_a или N'_b включают модификации чередующегося профиля.

Мотив $Y'Y'Y'$ присутствует в сайте или рядом с сайтом расщепления антисмысловой цепи. Например, когда дцРНКи средство имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, мотив $Y'Y'Y'$ может присутствовать в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при отсчете начиная с первого нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно, при отсчете начиная с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области, от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления мотив $Y'Y'Y'$ присутствует в положениях 11, 12, 13.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в мотиве Y'Y'Y' являются 2'-ОМе модифицированными.

В некоторых вариантах осуществления k равно 1, а l равно 0, или k равно 0, а l равно 1, или k и l равны 1.

Антисмысловая цепь может быть, таким образом, представлена следующими формулами:

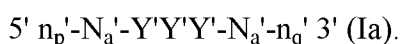


Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IIc), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления N_b равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления k равно 0, а l равно 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



Если антисмысловая цепь представлена в виде формулы (IIa), каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X', Y' и Z' может быть одним и тем же или может отличаться друг от друга.

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован ЗНК, CRN, UNA, cEt, гликольнуклеиновой кислотой (GNA), гекситнуклеиновой кислотой (HNA), 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, могут представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи средства может содержать мотив YYY, присутствующий в положениях 9, 10 и 11 цепи, когда дуплексная область имеет длину 21 нт, при отсчете начиная с первого нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, при отсчете начиная с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланговых модификаций на противоположном конце дуплексной области; при этом каждый XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе модификацию или 2'-F модификацию.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', присутствующий в положениях 11, 12, 13 цепи, при отсчете начиная с первого нуклеотида от 5'-конца, или, необязательно, при отсчете начиная с первого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланговых модификаций на противоположном конце дуплексной области; и каждый X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе модификацию или 2'-F модификацию.

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

Таким образом, дцРНКи средства для применения в способах согласно изобретению могут включать смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь содержит 14-30 нуклеотидов, и где дуплекс иРНК представлен следующей формулой (III):

смысловая: $5' n_p-N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a-n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_{p'}-N_{a'}-(X'X'X')_k-N_{b'}-Y'Y'Y'-N_{b'}-(Z'Z'Z')_l-N_{a'}-n_{q'} 5'$

(III)

в которой:

каждое i, j, k и l независимо равно 0 или 1;

каждое p, p', q и q' независимо равно 0-6;

каждый N_a и $N_{a'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность включает по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и $N_{b'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где

каждый $n_p, n_p, n_{q'}$ и n_q , каждый из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет собой нуклеотид в выступающем конце; и

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

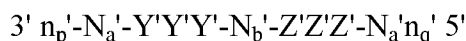
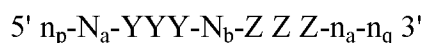
В одном варианте осуществления i равно 0, а j равно 0; или i равно 1, а j равно 0; или

i равно 0, а j равно 1; или i и j равны 0; или i и j равны 1. В другом варианте осуществления k равно 0, а l равно 0; или k равно 1, а l равно 0; k равно 0, а l равно 1; или k и l равны 0; или k и l равны 1.

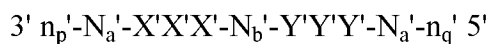
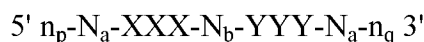
Иллюстративные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс иРНК, включают формулы, представленные ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIId)

Когда дцРНКи средство представлено формулой (IIIa), каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда дцРНКи средство представлено формулой (IIIb), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда дцРНКи средство представлено в виде формулы (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда дцРНКи средство представлен в виде формулы (IIIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, включающую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо включает модификации чередующегося профиля.

Каждый из X , Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), может быть одним и тем же или отличающимся от других.

Когда дцРНКи средство представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из

нуклеотидов Y' . В альтернативе по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y' ; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y' .

Когда дцРНКи средство представлено формулой (IIIb) или (IIIc), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z' . В альтернативе по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' ; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' .

Когда дцРНКи средство представлено в виде формулы (IIIc) или (IIIe), по меньшей мере один из этих нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X' . В альтернативе по меньшей мере два из этих нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' ; или все три из этих нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' .

В некоторых вариантах осуществления модификация на нуклеотиде Y отличается от модификации на нуклеотиде Y' , модификация на нуклеотиде Z отличается от модификации на нуклеотиде Z' , или модификация на нуклеотиде X отличается от модификации на нуклеотиде X' .

В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНКи средство представлено формулой (IIIe), модификации N_a являются 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями. В других вариантах осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIIe), модификации N_a являются 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями, и $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом фосфоротиоатной связью. В других вариантах осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIIe), модификации N_a являются 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом фосфоротиоатной связью, и смысловая цепь конъюгирована с одним или больше производными GalNAc, присоединенными через бивалентный или тривалентный разветвленный линкер (описанный ниже). В других вариантах осуществления, когда РНКи средство представлено формулой (IIIe), модификации N_a являются 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом фосфоротиоатной связью, смысловая цепь включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или больше производными GalNAc, необязательно присоединенными через бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНКи средство представлено формулой (IIIa), модификации N_a являются 2'-О-метил или 2'-фтор модификациями, $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом фосфоротиоатной связью, смысловая цепь включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или больше производными GalNAc, присоединенными через бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство представляет собой

мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно включает лиганд. Каждый из дуплексов может быть направлен против одного и того же гена или двух разных генов; или каждый из дуплексов может быть направлен против одного и того же гена в двух разных сайтах-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления дцРНКи средство представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или больше дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно включает лиганд. Каждый из дуплексов может быть направлен против одного и того же гена или двух разных генов; или каждый из дуплексов может быть направлен против одного и того же гена в двух разных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления два дцРНКи средства, представленные по меньшей мере одной из формул (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), соединены друг с другом на 5'-конце и одном или обоих 3'-концах и, необязательно, конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может быть направлено против одного и того же гена или двух разных генов; или каждое из средств может быть направлено против одного и того же гена в двух разных сайтах-мишенях.

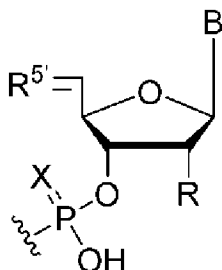
В некоторых вариантах осуществления средство РНКи согласно изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор модификацию, например, 10 или меньше нуклеотидов с 2'-фтор модификацией. Например, средство РНКи может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор модификацией. В конкретном варианте осуществления РНКи средство согласно изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор модификацией в смысловой цепи и 6 нуклеотидов с 2'-фтор модификацией в антисмысловой цепи. В еще одном конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор модификацией в антисмысловой цепи.

В других вариантах осуществления средство РНКи согласно изобретению может содержать очень малое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор модификацию, например, 2 или меньше нуклеотидов, содержащих 2'-фтор модификацию. Например, средство РНКи может содержать 2, 1 из 0 нуклеотидов с модификацией 2'-фтор. В конкретном варианте осуществления средство РНКи может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор модификацией в антисмысловой цепи.

В различных публикациях описаны мультимерные иРНК, которые могут применяться в способах согласно изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США 7,858,769, WO2010/141511, WO2007/117686,

WO2009/014887 и WO2011/031520, все содержание каждого из которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию РНКи средства, как описано в настоящем документе. В иллюстративных вариантах осуществления 5'-винилфосфонат модифицированный нуклеотид согласно изобретению имеет структуру:



где X представляет собой O или S;

R представляет собой водород, гидроксиль, фтор или C₁₋₂₀алкокси (например, метокси или н-гексадецилокси);

R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между C5' углеродом и R^{5'} находится в *E* или *Z* ориентации (например, *E* ориентации); и

B представляет собой нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, где, необязательно, B представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

Винилфосфонат согласно настоящему изобретению может быть присоединен к антисмысловой или смысловой цепи дцРНК согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления винилфосфонат согласно настоящему изобретению присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК

Винилфосфатные модификации также предусматриваются в композициях и способах настоящего изобретения. Иллюстративная винилфосфатная структура включает предыдущую структуру, где R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между C5' углеродом и R^{5'} находится в *E* или *Z* ориентации (например, *E* ориентации).

Как более подробно описано ниже, иРНК, которая содержит конъюгирования одной или более углеводных молекул с иРНК, может оптимизировать одно или более свойств иРНК. Во многих случаях углеводная молекула будет присоединена к модифицированной субъединице иРНК. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц иРНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (например, циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой был таким способом заменен сахар рибоза, именуется в настоящем документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или больше атомов в кольце могут быть гетероатом, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой

системой или может содержать два или больше колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может быть полностью насыщенной кольцевой системой или может содержать одну или больше двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду при посредстве носителя. Носители включают: (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к скелету", такую как две "точки присоединения к скелету" и (ii) по меньшей мере одну "точку привязывания". "Точка приприсоединения к скелету" при использовании в настоящем документе относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или, как правило, связи, доступной и подходящей для включения носителя в скелет, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например серосодержащий, скелет рибонуклеиновой кислоты. "Точка привязывания" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к атому в составляющем кольце циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к скелету), который присоединяет выбранную молекулу. Такая молекула может быть, например, углеводом, например моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом или полисахаридом. Необязательно выбранная молекула соединена промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или, как правило, предоставлять связь, подходящую для включения или присоединения другого химического соединения, например лиганда, к составляющему кольцу.

иРНК может быть конъюгирована с лигандом посредством носителя, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; в некоторых вариантах осуществления циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; в некоторых вариантах осуществления ациклическая группа выбрана из сериноловой цепи или диэтаноламиновой цепи.

i. Термически дестабилизирующие модификации

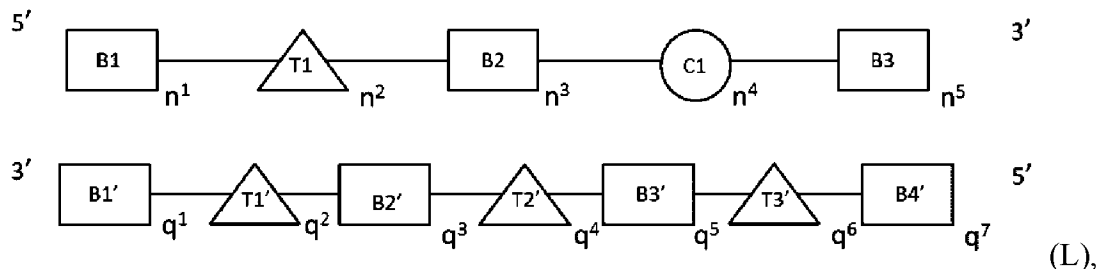
В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК может быть оптимизирована для РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочную область антисмысловой цепи. При использовании в настоящем документе "затравочная область" означает в положения 2-9 на 5'-конце указанной цепи. Например, термически дестабилизирующие модификации могут быть включены в затравочную область антисмысловой цепи для уменьшения или ингибирования нецелевого сайленсинга гена.

Термин "термически дестабилизирующая модификация(и)" включает модификацию(и), которая приводит к дцРНК с более низкой общей температурой плавления (T_p), чем T_p дцРНК без такой модификации(й). Например, термически дестабилизирующая модификация(и) может снижать T_p дцРНК на 1-4°C, например, один,

два, три или четыре градуса Цельсия. И термин "термически дестабилизирующий нуклеотид" относится к нуклеотиду, содержащему одну или больше термически дестабилизирующих модификаций.

Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, включающей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в положениях первых 9 нуклеотидов, при подсчете от 5'-конца, антисмысловой цепи имеют сниженную активность нецелевого сайленсинга гена. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь включает по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или больше) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в положениях первых 9 нуклеотидов 5'-области антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления одна или больше термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или, в некоторых вариантах осуществления, положениях 4-8, от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация(и) дуплекса расположена в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой цепи.

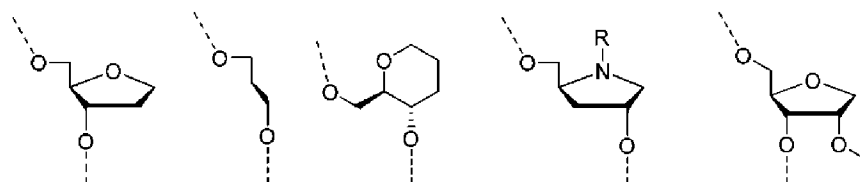
Средство иРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь содержит 14-40 нуклеотидов. Средство РНКи может быть представлено формулой (L):



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

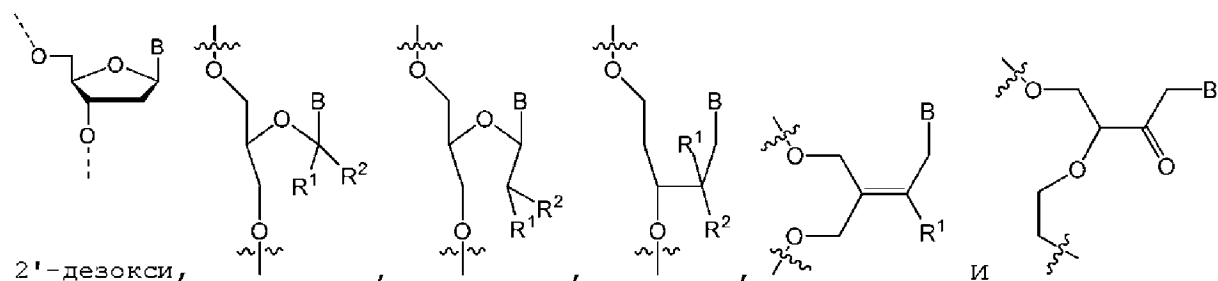
C1 представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, расположенный в участке, противоположном затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-8 на 5'-конце антисмысловой цепи). Например, C1 присутствует в положении смысловой цепи, которое спаривается с нуклеотидом в положениях 2-8 на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном примере C1 присутствует в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи.

Нуклеотид C1 несет термически дестабилизирующую модификацию, которая может включать абазическую модификацию; некомплементарность с противостоящим нуклеотидом в дуплексе; и модификацию сахара, такую как 2'-дезокс модификация или ациклический нуклеотид, например, разомкнутые нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериннуклеиновая кислота (GNA). В одном варианте осуществления C1 имеет термически дестабилизирующую модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) некомплементарности с противостоящим нуклеотидом в антисмысловой цепи; ii) абазической модификации, выбранной из группы, состоящей из:

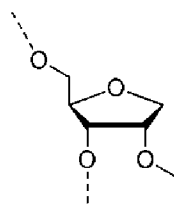


; и iii) модификации

сахара, выбранной из группы, состоящей из:



где В является модифицированным или немодифицированным нуклеиновым основанием, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляют собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация в C1 представляют собой некомплементарную пару нуклеиновых оснований, выбранную из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и, необязательно, по меньшей мере одно нуклеиновое основание в некомплементарной паре является 2'-дезокс нуклеиновым основанием. В одном примере термически дестабилизирующей



модификацией в C1 является GNA или

Каждый T1, T1', T2' и T3' независимо представляет нуклеотид, включающий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-OMe модификации. Стерический объем относится к объему стерических эффектов модификации. Способы для определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может быть в 2'-положении сахара рибозы нуклеотида или модификацией в не содержащем рибозу

нуклеотиде, нециклическом нуклеотиде или скелете нуклеотида, которое подобно или эквивалентно 2' положению сахара рибозы, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе модификации. Например, каждый T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, ЛНК, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или ЛНК. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

n^1 , n^3 , и q^1 независимо имеют длину 4-15 нуклеотидов.

n^5 , q^3 , и q^7 независимо имеют длину 1-6 нуклеотидов.

n^4 , q^2 , и q^6 независимо имеют длину 1-3 нуклеотида; в альтернативе n^4 равно 0.

q^5 независимо имеет длину 0-10 нуклеотидов.

n^2 и q^4 независимо имеют длину 0-3 нуклеотида.

В альтернативе n^4 имеет длину 0-3 нуклеотида.

В одном варианте осуществления n^4 может быть 0. В одном примере n^4 равно 0, и q^2 и q^6 равны 1. В другом примере n^4 равно 0, а q^2 и q^6 равны 1 с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления каждое n^4 , q^2 и q^6 равно 1.

В одном варианте осуществления каждое n^2 , n^4 , q^2 , q^4 и q^6 равно 1.

В одном варианте осуществления C1 в положении 14-17 на 5'-конце смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет длину 19-22 нуклеотида, а n^4 равно 1. В одном варианте осуществления C1 присутствует в положении 15 на 5'-конце смысловой цепи

В одном варианте осуществления T3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' присутствует в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, а q^6 равно 1.

В одном варианте осуществления T1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' присутствует в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, а q^2 равно 1.

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

В одном варианте осуществления T1' и T3' отделены 11 нуклеотидами (т.е. без учета нуклеотидов T1' и T3').

В одном варианте осуществления T1' присутствует в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' присутствует в положении 14 от 5'-конца

антисмысловой цепи, а q^2 равно 1, и модификация в 2'-положении или положениях в нерибозе, ациклическом или скелете обеспечивает меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления ТЗ' присутствует в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере ТЗ' присутствует в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, а q^6 равно 1, и модификация в 2' положении или положениях в нерибозе, ациклическом или скелете обеспечивают меньший или равный стерический объем, как 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления Т1 присутствует в сайте расщепления смысловой цепи. В одном примере Т1 присутствует в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет длину 19-22 нуклеотида, и n^2 равно 1. В иллюстративном варианте осуществления Т1 присутствует в сайте расщепления смысловой цепи в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет длину 19-22 нуклеотида, и n^2 равно 1,

В одном варианте осуществления Т2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере Т2' присутствует в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равно 1.

В иллюстративном варианте осуществления Т1 присутствует в сайте расщепления смысловой цепи, например, в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет длину 19-22 нуклеотида, и n^2 равно 1; Т1' присутствует в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равно 1, и модификация в Т1' присутствует в 2'-положении сахара рибозы или в положениях в нерибозе, ациклическом или скелете, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза; Т2' присутствует в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равно 1; и ТЗ' присутствует в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равно 1, и модификация в ТЗ' присутствует в 2'-положении или в положениях в нерибозе, ациклическом или скелете, которые обеспечивают меньший или равный стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления Т2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере Т2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи, а q^4 равно 2.

В одном варианте осуществления Т2' начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере Т2' присутствует в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равно 1.

В одном варианте осуществления В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 1, ВЗ' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 6, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя

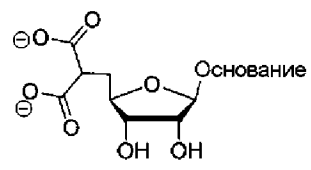
В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 6, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5

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

равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1.

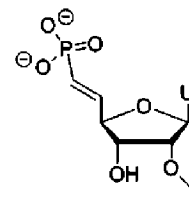
В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи).

Средство РНКи может включить фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфорсодержащая группа могут быть 5'-концевым фосфатом (5'-P), 5'-концевым фосфоротиоатом (5'-PS), 5'-концевым фосфородитиоатом (5'-PS2), 5'-концевым винилфосфонатом (5'-VP), 5'-концевым

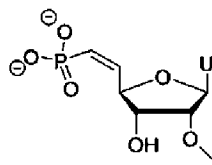
метилфосфонатом (MePhos) или 5'-дезоксид-5'-C-малонилом ().

Когда 5'-концевой фосфорсодержащей группой является 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP),

5'-VP может быть любым из 5'-E-VP изомера (т.е. транс-винилфосфата



5'-Z-VP изомера (т.е. цис-винилфосфата



или их смесью.

В одном варианте осуществления средство РНКи включает фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи. В одном варианте осуществления средство РНКи включает фосфорсодержащую группу на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-P. В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-P на антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-PS. В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-PS на антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-VP. В одном варианте осуществления средство РНКи включает 5'-VP на антисмысловой цепи. В одном варианте

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

включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМe, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМe, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМe, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1

равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1. ДцРНК средство также включает 5'-PS.

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

собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

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

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-P.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно

0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-PS2.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

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

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

8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 2'ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 2'ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 2'ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. ДцРНКи средство РНК также включает 5'-PS2.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 2'ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-P.

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

8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5

равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуаносин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-PS2.

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

собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1. Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

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

равно 4, q^4 равно 0, $B3'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^5 равно 7, $T3'$ представляет собой $2'$ -F, q^6 равно 1, $B4'$ представляет собой $2'$ -F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2.

В одном варианте осуществления $B1$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, n^1 равно 8, $T1$ представляет собой $2'$ -F, n^2 равно 3, $B2$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, $B3$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^5 равно 3, $B1'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^1 равно 9, $T1'$ представляет собой $2'$ -F, q^2 равно 1, $B2'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, $B3'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^5 равно 7, $T3'$ представляет собой $2'$ -F, q^6 равно 1, $B4'$ представляет собой $2'$ -F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуаносин-3'-фосфат-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления $B1$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, n^1 равно 8, $T1$ представляет собой $2'$ -F, n^2 равно 3, $B2$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, $B3$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^5 равно 3, $B1'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^1 равно 9, $T1'$ представляет собой $2'$ -F, q^2 равно 1, $B2'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^3 равно 4, $T2'$ представляет собой $2'$ -F, q^4 равно 2, $B3'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^5 равно 5, $T3'$ представляет собой $2'$ -F, q^6 равно 1, $B4'$ представляет собой $2'$ -ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-Р и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд присутствует на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления $B1$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, n^1 равно 8, $T1$ представляет собой $2'$ -F, n^2 равно 3, $B2$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, $B3$ представляет собой $2'$ -ОМе, n^5 равно 3, $B1'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^1 равно 9, $T1'$ представляет собой $2'$ -F, q^2 равно 1, $B2'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^3 равно 4, $T2'$ представляет собой $2'$ -F, q^4 равно 2, $B3'$ представляет собой $2'$ -ОМе или $2'$ -F, q^5 равно 5, $T3'$ представляет собой $2'$ -F, q^6 равно 1, $B4'$ представляет собой $2'$ -ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении

1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд присутствует на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и направляющий лиганд.

В одном варианте осуществления 5'-VP присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2 и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS2 присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5

равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-Р и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд присутствует на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-PS и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

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

собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-PS2 и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS2 присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца). Средство РНКи также включает 5'-дезоксид-5'-С-малонил и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксид-5'-С-малонил присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

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

равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-Р и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 5, ТЗ' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

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

равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2 и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS2 присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равно 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-Р и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

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

равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равно 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равно 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равно 7, n^4 равно 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равно 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-PS2 и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS2 присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

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

равно 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равно 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равно 4, q^4 равно 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равно 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равно 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положении 1-5 смысловой цепи (при отсчете от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 1 и 2, и двумя модификациями фосфоротиоатными межнуклеотидными связями в положениях 18-23 антисмысловой цепи (при отсчете от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство РНКи также включает 5'-дезоксигаллокси-5'-С-малонил и направляющий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигаллокси-5'-С-малонил присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи, а направляющий лиганд - на 3'-конце смысловой цепи.

В конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенных через тривалентный разветвленный линкер; и
 - (iii) 2'-F модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21, и 2'-ОМе модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (при отсчете от 5'-конца);
 - и
 - (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 23 нуклеотидов;
 - (ii) 2'-ОМе модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23, и 2'-F модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (при отсчете от 5'-конца); и
 - (iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);
- где дцРНК средства имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 21 нуклеотида;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;
 - (iii) 2'-F модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21, и 2'-ОМе модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (при отсчете от 5'-конца); и
 - (iv) фосфоротиоатных межнуклеотидных связей между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотидов;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где дцРНК средства имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенных через тривалентный разветвленный линкер;

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

(iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средство РНКи имеет оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе модификации в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14 и 16-21, и 2'-F модификации

в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средство РНКи имеет оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;

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

(iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупом конце в 5'-концах антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный

линкер;

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

(iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;

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

(iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 25 нуклеотидов;

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

(iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

(a) смысловую цепь, имеющую:

- (i) длину 21 нуклеотид;
- (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;
- (iii) 2'-ОМе модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, и 2'-F модификации в положениях 7 и 9-11; и
- (iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15 и 17-23, и 2'-F модификации в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (при отсчете от 5'-конца); и
 - (iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему изобретению включает:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 21 нуклеотид;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;
 - (iii) 2'-ОМе модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, и 2'-F модификации в положениях 7 и 9-11; и
 - (iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23, и 2'-F модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (при отсчете от 5'-конца); и
 - (iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22, и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство РНКи согласно настоящему

изобретению включает:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 19 нуклеотидов;
 - (ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через тривалентный разветвленный линкер;
 - (iii) 2'-ОМе модификации в положениях 1-4, 6 и 10-19, и 2'-F модификации в положениях 5 и 7-9; и
 - (iv) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (при отсчете от 5'-конца);

и

- (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину 21 нуклеотид;
 - (ii) 2'-ОМе модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21, и 2'-F модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (при отсчете от 5'-конца); и
 - (iii) межнуклеотидные фосфоротиоатные связи между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями 19 и 20 нуклеотида, и между положениями 20 и 21 нуклеотида (при отсчете от 5'-конца);

где средства РНКи имеют оверхенг из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления иРНК для применения в способах согласно изобретению является средством, выбранным из средств, перечисленных в любой из Таблиц 2-5. Эти средства могут дополнительно включать лиганд.

III. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в иРНК согласно изобретению включает химическое связывание с иРНК одного или больше лигандов, молекул или конъюгатов, которые улучшают активность, клеточное распределение или клеточный захват иРНК, например, в клетку. Такие молекулы включают, без ограничения перечисленными, липидные молекулы, такие как молекулу холестерина (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556). В других вариантах осуществления лигандом является холевая кислота (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al. al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995), 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), полиаминовая или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантануксусная кислота (Manoharan et

al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитильная группа (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) или молекула октадециламина или гексиламинокарбонилноксистерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В некоторых вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, таргетинг или время жизни иРНК средства, в которое он включен. В некоторых 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 соединением, в котором не содержится такой лиганд. В некоторых вариантах осуществления лиганды не участвуют в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), липопротеин низкой плотности (ЛПНП) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновую кислоту); или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, которая представляет собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактида-ко-гликолида), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (ГПМА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (ПВС), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметик полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать направляющие группы, например, вещество, направленно взаимодействующее с клеткой или тканью, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Направляющей группой может быть тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, многовалентная лактоза, многовалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, многовалентная манноза, многовалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, многовалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспаратат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой многовалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркаляторы (например, акридины), сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и конъюгаты пептидов (например, пептид антеннапедии, Tat-пептид), алкилирующие агенты, фосфат, аминок, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), МПЭГ, [МПЭГ]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазола, Eu³⁺ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут быть белками, например, гликопротеинами или пептидами, например, молекулами, обладающими специфическим сродством к колиганду, или антителами, например, антителом, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, многовалентную лактозу, многовалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, многовалентную маннозу или многовалентную фукозу. Лиганд может быть, например, липополисахаридом, активатором p38 MAP киназы или активатором NF-κB.

Лиганд может быть веществом, например, лекарственным средством, которое может увеличивать захват иРНК средства клеткой, например, путем нарушения цитоскелета клетки, например, путем нарушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксол, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джасплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к иРНК, как описано в настоящем документе, действует как модулятор фармакокинетики (модулятор ФК). Модуляторы ФК включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белоксвязывающие средства, ПЭГ, витамины и т.д. Примеры модуляторов ФК включают, без ограничения перечисленными, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохлеовую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфоротиоатных связей, связываются с белком сыворотки, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например,

олигонуклеотиды приблизительно из 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, включающие множество фосфоротиоатных связей в скелете, также могут применяться в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве ФК модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, белки сыворотки), также подходят для применения в качестве ФК модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе.

Лиганд-конъюгированные иРНК согласно изобретению могут быть синтезированы при использовании олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, например, полученную в результате присоединения линкерной молекулы к олигонуклеотиду (как описано ниже). Такой реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно реагировать с доступными в продаже лигандами, лигандами, которые синтезированы с любой из различных защитных групп, или лигандами, к которым присоединен линкерный фрагмент.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах согласно изобретению, могут быть легко и рутинно получены с помощью хорошо известного метода твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продают несколько поставщиков, включая, например, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Любые другие способы такого синтеза, известные из уровня техники, могут использоваться дополнительно или в качестве альтернативы. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В лиганд-конъюгированных иРНК и несущих молекулу лиганда сиквенс-специфических связанных нуклеозидах согласно настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем ДНК-синтезаторе с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут линкерный фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотид или нуклеозид-конъюгатов, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидных лиганд-несущих структурных блоков.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгатов, которые уже несут линкерный фрагмент, обычно завершают синтез сиквенс-специфичных связанных нуклеозидов, после чего молекулу лиганда подвергают реакции с линкерным фрагментом с образованием лиганд-конъюгированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора при использовании фосфорамидитов, полученных из лиганд-нуклеозид конъюгатов, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые доступны в продаже и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Липидные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида в

некоторых вариантах осуществления связывает сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). ЧСА-связывающий лиганд обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, в ткани-мишени, отличной от почки. Например, тканью-мишенью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать ЧСА, также могут использоваться в качестве лигандов. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может: (а) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (б) усиливать направленную доставку или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану, или (с) можно использоваться для регуляции связывания с сывороточным белком, например, ЧСА.

Лиганд на основе липида может использоваться для ингибирования, например контроля, связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липида, который связывается с ЧСА более сильно, с меньшей вероятностью будет направляться в почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липида, который связывается с ЧСА менее сильно, может использоваться для направления конъюгата в почки.

В некоторых вариантах осуществления лиганд на основе липида связывает ЧСА. В некоторых вариантах осуществления он связывает ЧСА с достаточной аффинностью, в результате чего конъюгат, в некоторых вариантах осуществления, распределяется в ткани, не относящейся к почкам. Впрочем, предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание ЧСА-лиганда было необратимым.

В других вариантах осуществления лиганд на основе липидов слабо связывает или вообще не связывает ЧСА, при этом конъюгат, в некоторых вариантах осуществления, будет распределяться в почках. Вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему также могут использоваться другие фрагменты, которые направленно взаимодействуют с клетками почек.

В другом аспекте лиганд представляет собой молекулу, например витамин, которая захватывается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно полезны для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включены ЧСА и липопротеины низкой плотности (ЛПНП).

В. Средства, проникающие в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой проникающее в клетку средство, в некоторых вариантах осуществления спиральное проникающее в клетку средство. В некоторых вариантах осуществления средство является амфипатическим. Иллюстративное средство представляет собой пептид, такой как tat-пептид или пептид антеннопедии. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицирован, включая

пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральное средство в некоторых вариантах осуществления является альфа-спиральным средством, которое в некоторых вариантах осуществления имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может быть пептидом или пептидомиметиком. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептидов и пептидомиметиков к иРНК средствам может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, за счет улучшения клеточного распознавания и абсорбции. Молекула пептида или пептидомиметика может иметь длину приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 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). Пептидным фрагментом может быть дендримерный пептид, конформационно ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность транслокации в мембрану (MTS). Примером гидрофобного MTS-содержащего пептида является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 37). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 38)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть направляющим фрагментом. Пептидный фрагмент может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности Tat белка ВИЧ (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO: 39)) и белка антеннапедии *Drosophila* (RQIKIWFQNRMKWKK (SEQ ID NO: 40)) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна сфера - одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примерами пептида или пептидомиметика, привязанного к дцРНК средству через встроенную мономерную единицу в целях направленного воздействия на клетку, являются пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может варьировать от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для улучшения стабильности или непосредственных конформационных свойств. Может использоваться любая из структурных модификаций, описанных ниже.

RGD-пептид для применения в композициях и способах согласно изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, для облегчения направленной доставки в конкретную

ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD могут использоваться другие фрагменты, направленные на интегриновый лиганд. Иллюстративные конъюгаты такого лиганда направленно взаимодействуют с PECAM-1 или VEGF.

"Проникающий в клетку пептид" способен проникать в клетку, например, в микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающим в микробную клетку пептидом может быть, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или цекропин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Проникающий в клетку пептид также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, проникающий в клетку пептид может быть двухкомпонентным амфипатическим пептидом, таким как MPG, который получают при слиянии пептидного домена gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

С. Углеводные конъюгаты

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов согласно изобретению иРНК дополнительно включает углевод. Конъюгированная с углеводами иРНК удобна для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, как описано в настоящем документе. При использовании в настоящем документе "углевод" относится к соединению, которое либо представляет собой углевод как таковой, состоящий из одного или больше моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), причем с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы; или к соединению, содержащему в качестве своей части углеводный фрагмент, состоящий из одного или больше моносахаридных звеньев, каждое из которых содержит по меньшей мере шесть атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), причем с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлозу и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие две или три моносахаридные единицы (например, C5, C6, C7 или C8).

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно изобретению, представляет собой моносахарид.

В некоторых вариантах осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые включают одно или больше производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в патенте США 8,106,022, полное содержание которого настоящим включено в настоящий документ

посредством отсылки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc служит в качестве лиганда, который направляет иРНК в конкретные клетки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc направляет иРНК в клетки печени, например, выступая в качестве лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат включает одно или больше производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены через линкер, например, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с иРНК средством (например, с 3'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc конъюгирован с иРНК средством (например, с 5'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через одновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через трехвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через четырехвалентный линкер.

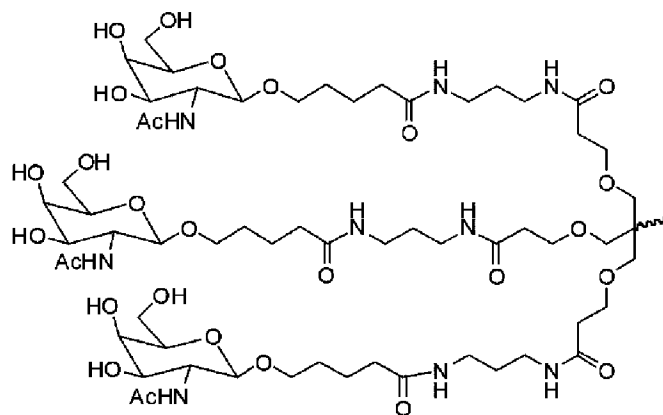
В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные РНКи средства согласно изобретению включают один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к иРНК средству. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные РНКи средства согласно изобретению включают множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного РНКи средства через множество одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи иРНК средства согласно изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующей петлю шпильки, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, то тогда каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо включать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через одновалентный линкер. Петля шпильки также может быть сформирована удлинненным оверхенгом в одной цепи дуплекса.

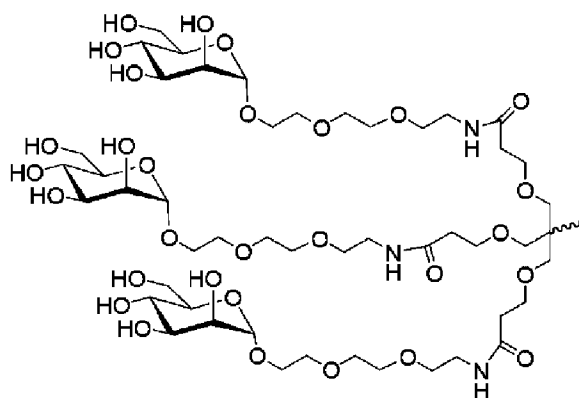
В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи иРНК средства согласно изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом

соответствующей другой цепи, образующей петлю шпильки, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, то тогда каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо включать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через одновалентный линкер. Петля шпильки также может быть сформирована удлинненным оверхенгом в одной цепи дуплекса.

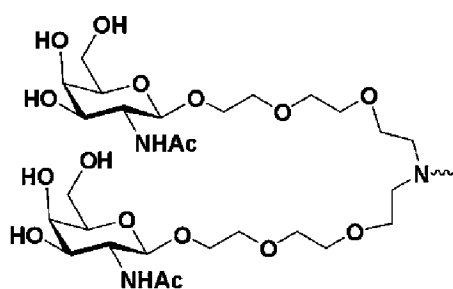
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно изобретению выбран из группы, состоящей из:



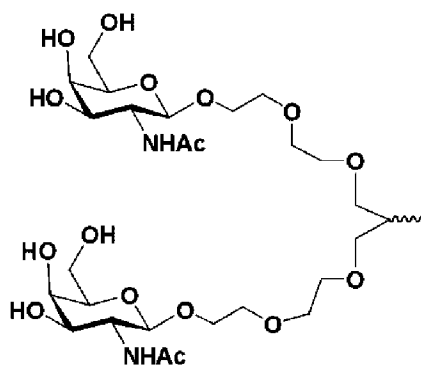
Формула II,



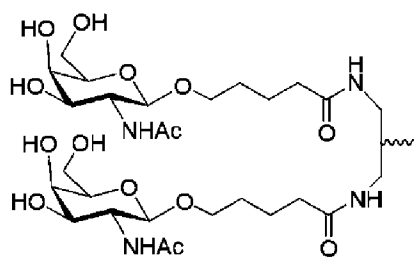
Формула III,



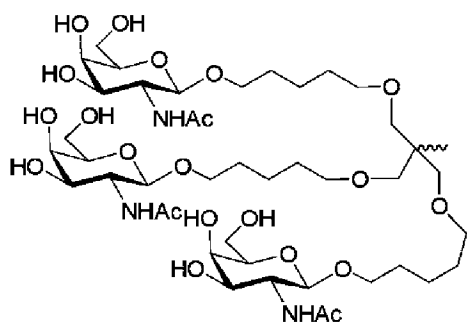
Формула IV,



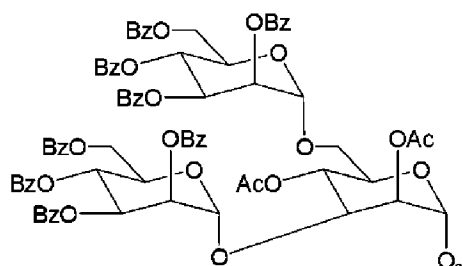
Формула V,



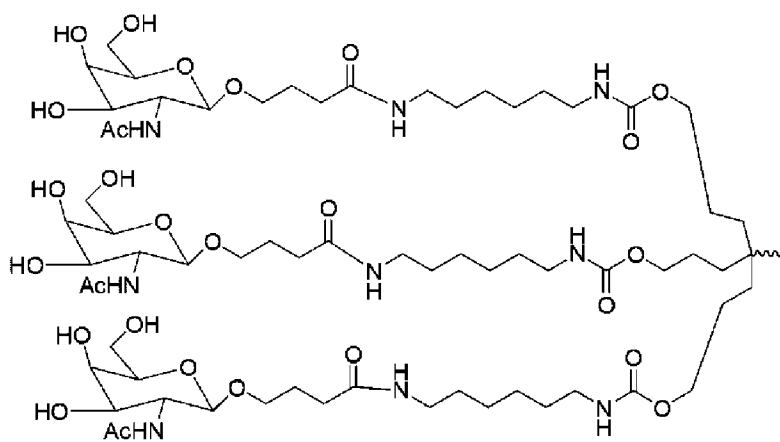
Формула VI,



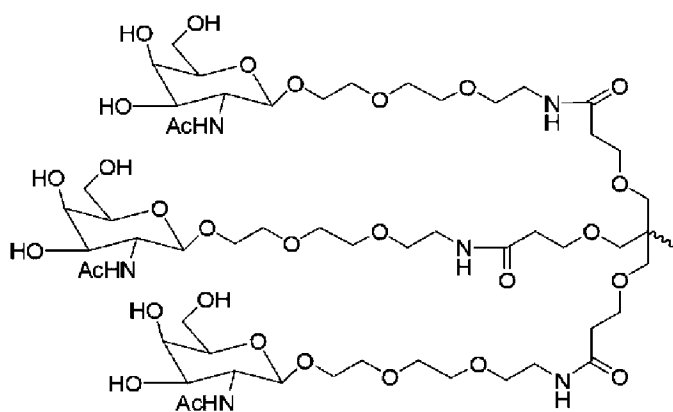
Формула VII,



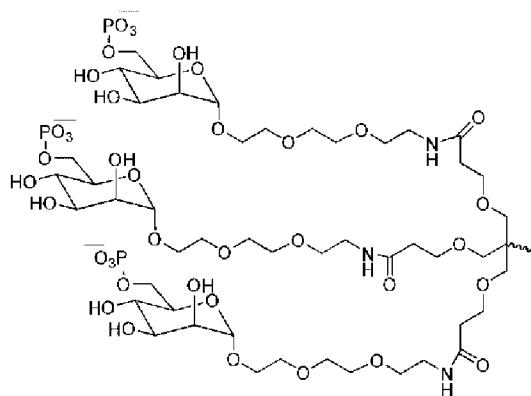
Формула VIII,



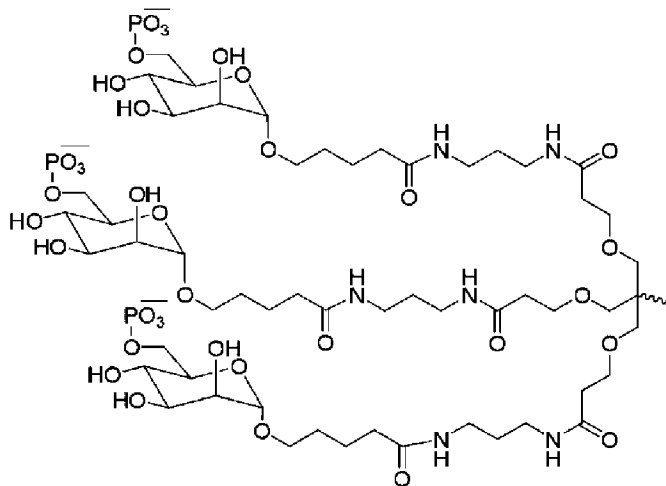
Формула IX,



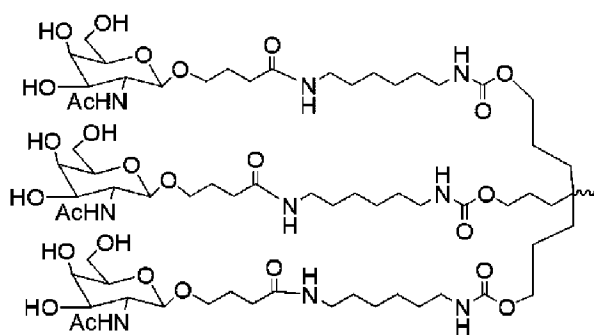
Формула X,



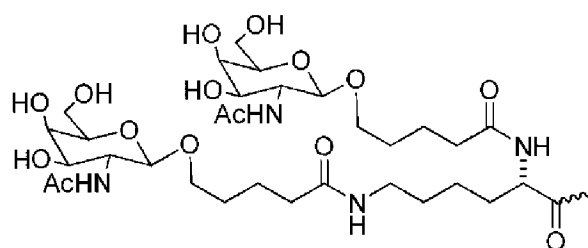
Формула XI,



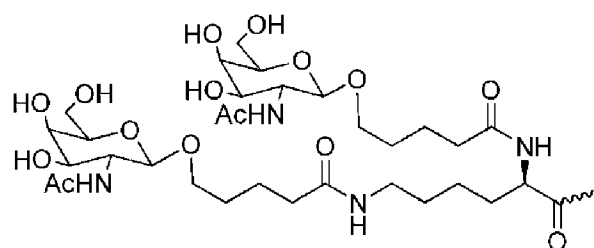
Формула XII,



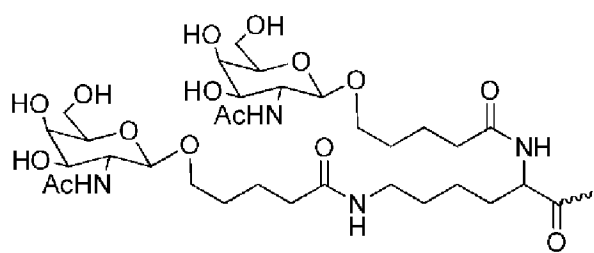
Формула XIII,



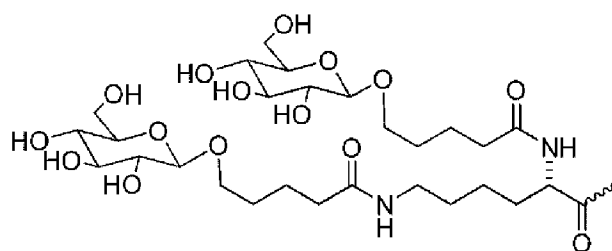
Формула XIV,



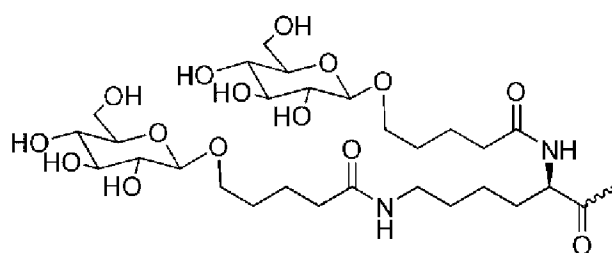
Формула XV,



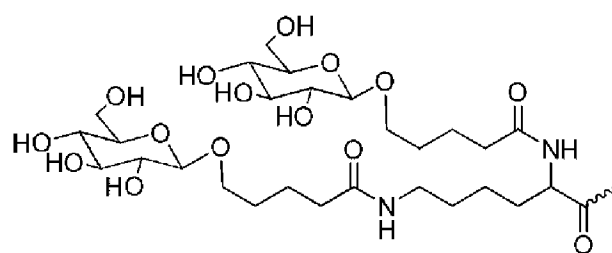
Формула XVI,



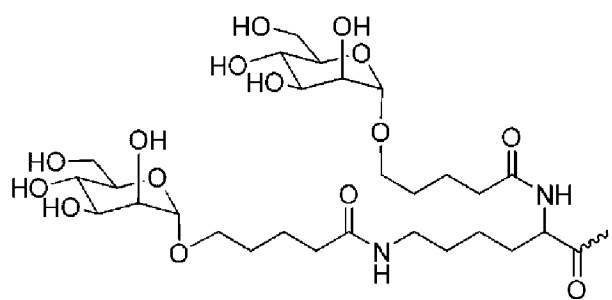
Формула XVII,



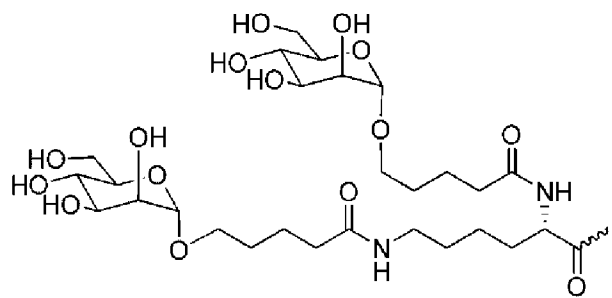
Формула XVIII,



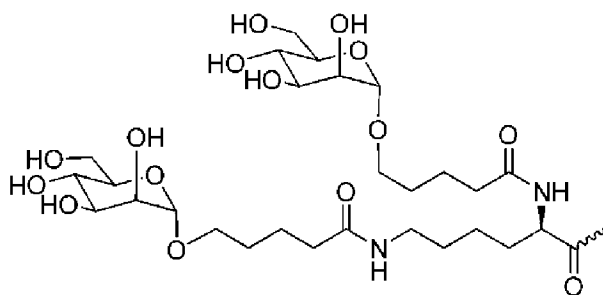
Формула XIX,



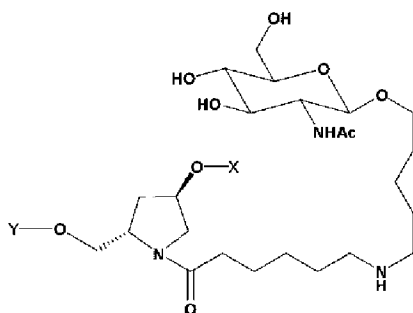
Формула XX,



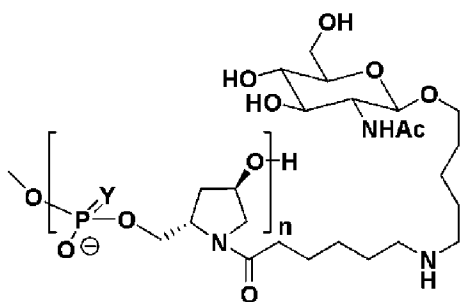
Формула XXI,



Формула XXII,

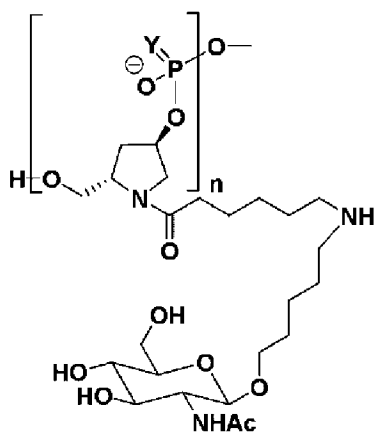


Формула XXIII;



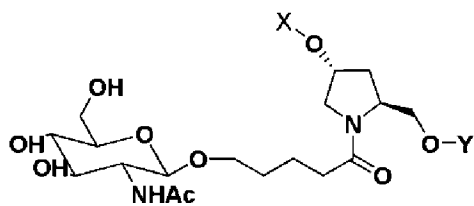
, где Y представляет собой O или S, и n равно 3-6

(Формула XXIV);

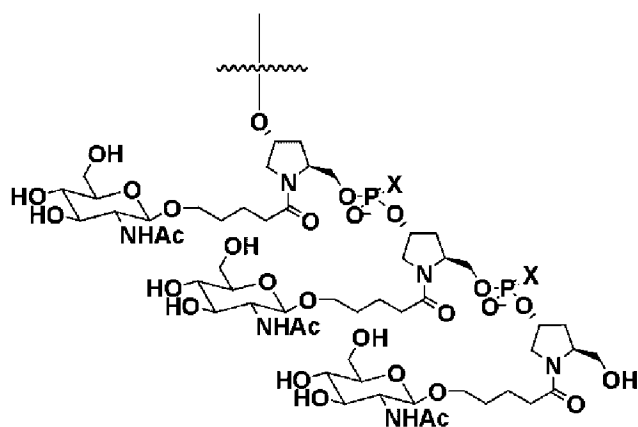


, где Y представляет собой O или S, и n равно 3-6

(Формула XXV);

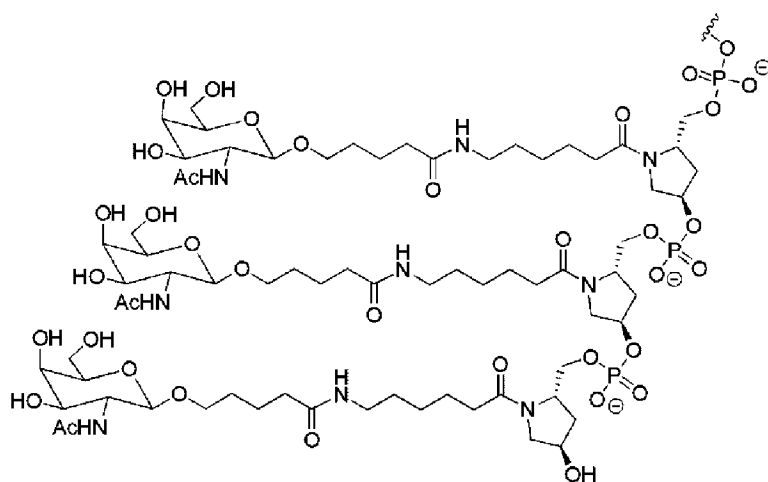


Формула XXVI;

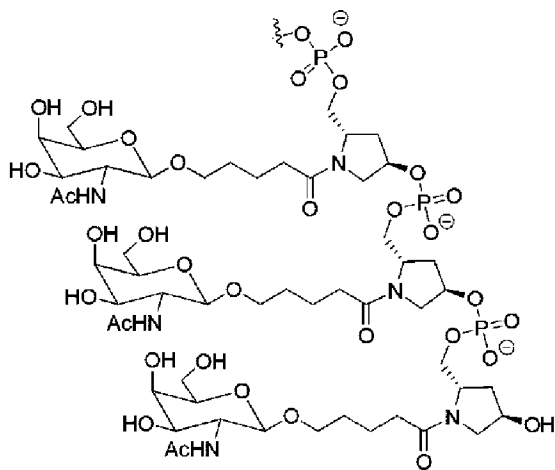


, где X представляет собой O или S

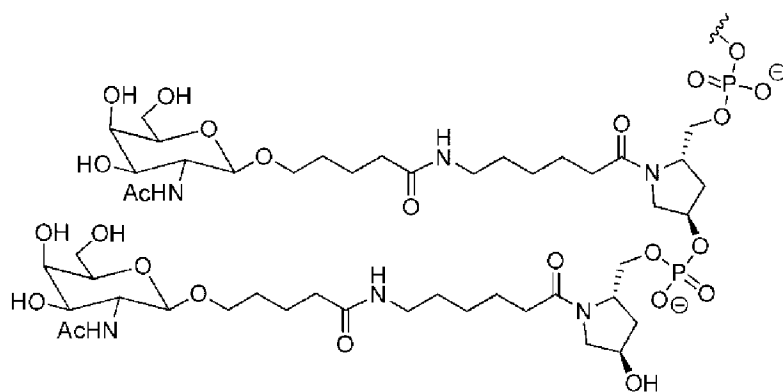
(Формула XXVII);



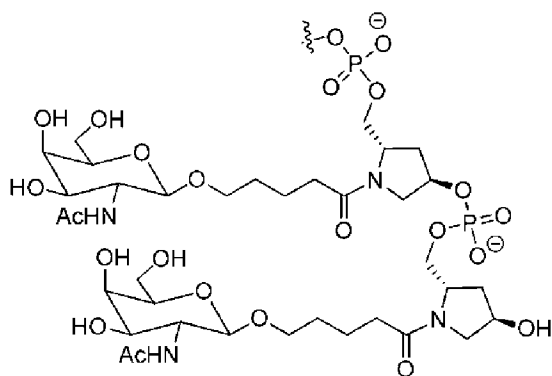
Формула XXVIII;



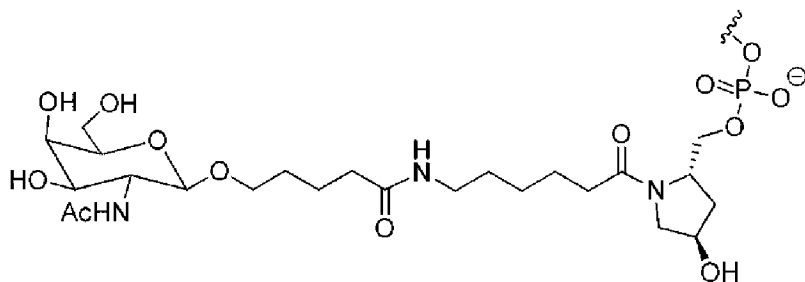
Формула XXIX;



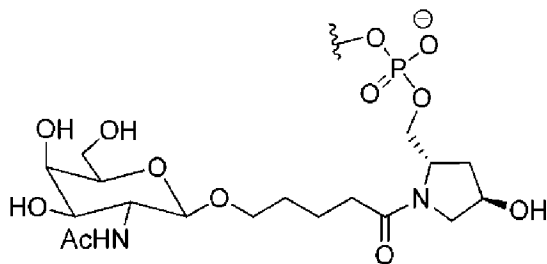
Формула XXX;



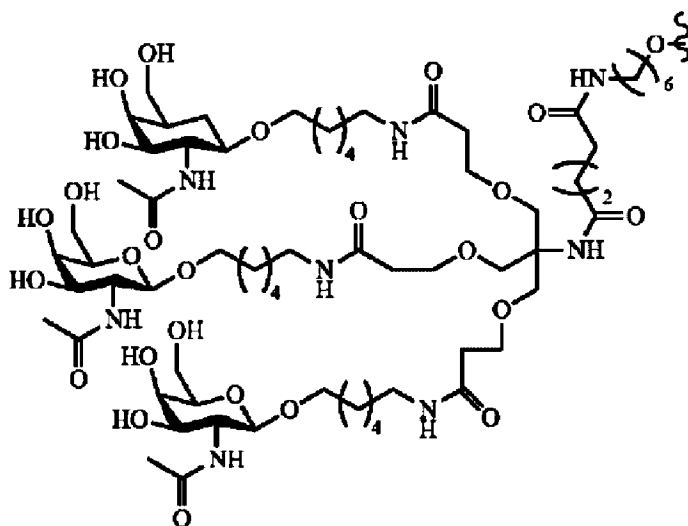
Формула XXXI;



Формула XXXII; и

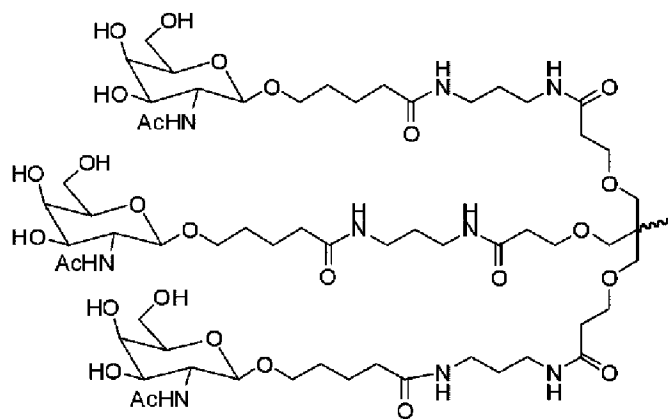


Формула XXXIII.



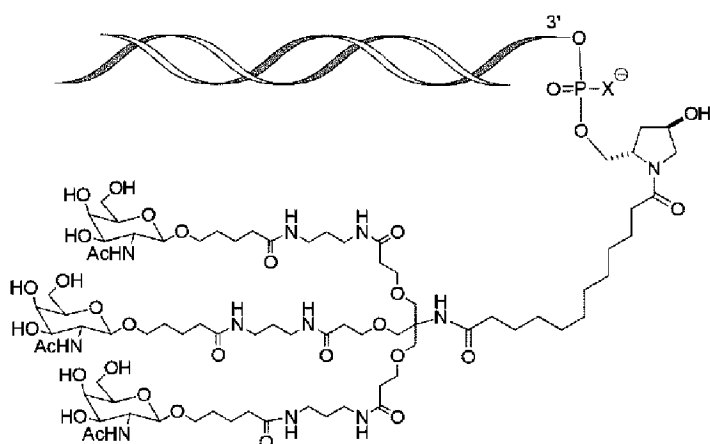
Формула XXXIV.

В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно изобретению, является моносахаридом. В одном варианте осуществления моносахаридом является N-ацетилгалактозамин, такой как

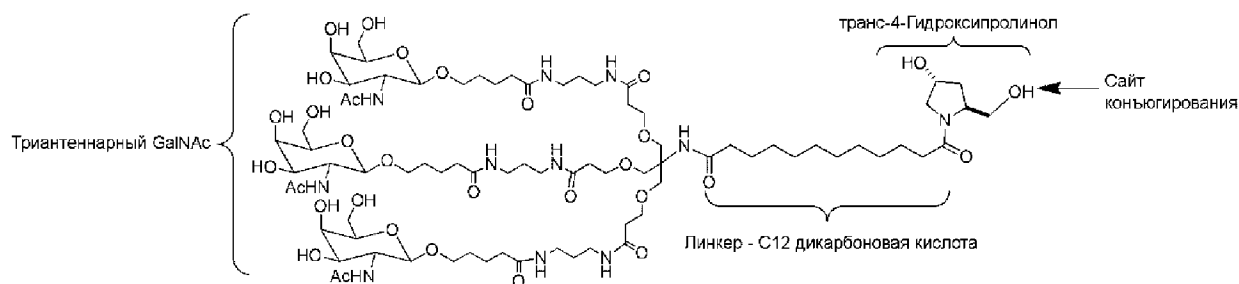


Формула II.

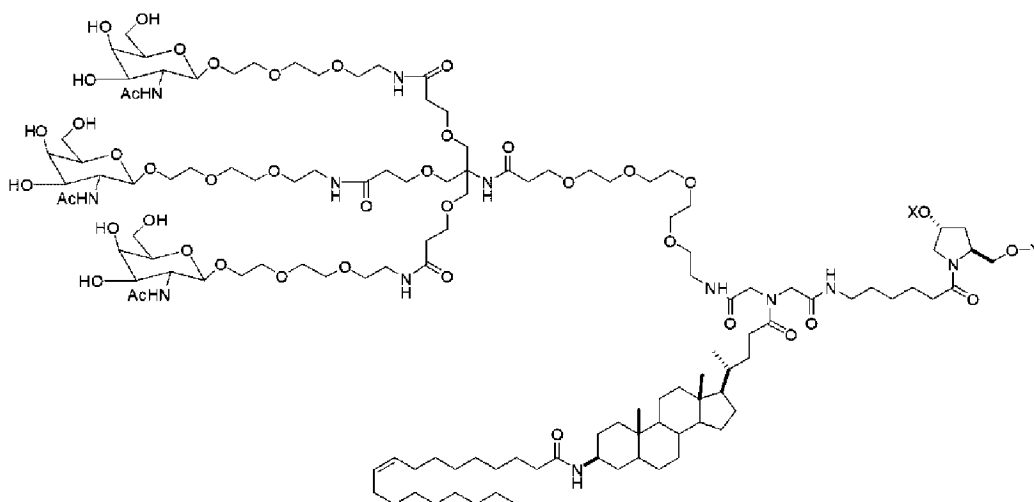
В некоторых вариантах осуществления средство РНКи присоединено к углеводному конъюгату через линкер, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



В некоторых вариантах осуществления средство РНКи конъюгировано с L96, как определено в Таблице 1 и показано ниже:

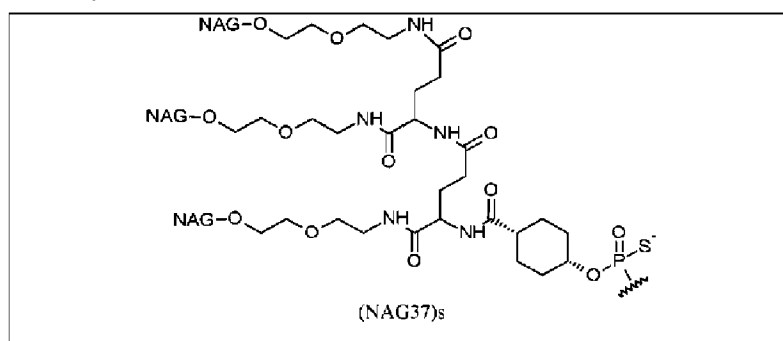


Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящий документ, включает, без ограничения:



(Формула XXXVI), когда один из X или Y является олигонуклеотидом, а другой является водородом.

В некоторых вариантах осуществления подходящий лиганд является лигандом, раскрытым в WO 2019/055633, все содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки. В одном варианте осуществления лиганд включает структуру, представленную ниже:



В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через бивалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК средству согласно изобретению через тривалентный линкер.

В одном варианте осуществления двухцепочечные РНКи средства согласно изобретению включают один или более GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к иРНК средству. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду через линкер на смысловой цепи или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой нити, 3'-концу смысловой нити, 5'-концу антисмысловой нити или 3'-концу антисмысловой нити. В одном варианте осуществления GalNAc присоединен к 3'-концу смысловой цепи, например, через трехвалентный линкер.

В других вариантах осуществления двухцепочечные РНКи средства согласно изобретению включают множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных

GalNAc, каждый из которых независимо присоединен к множеству нуклеотидов двухцепочечного РНКи средства через множество линкеров, например, одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи иРНК средства согласно изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, включающей множество неспаренных нуклеотидов, причем каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо включать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные через одновалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно включает один или больше дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, без ограничения перечисленными, модулятор ФК или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают описанные в публикациях РСТ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством отсылки.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, может быть присоединен к иРНК олигонуклеотиду при использовании различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения. Линкеры обычно включают прямую связь или атом, такой как кислород или серу, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, такую как, без ограничения перечисленным, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один

или более метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом или замещенным или незамещенным гетероциклом; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В одном варианте осуществления линкер содержит в приблизительно 1-24 атомов, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа является достаточно стабильной вне клетки, но при попадании в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, удерживаемых линкером вместе. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом референсном условии (которое, например, может быть выбрано для имитации или воспроизведения внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором референсном условии (которое, например, может быть выбрано для имитации или воспроизведения условий, существующих в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к расщепляющим факторам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию расщепляющих молекул. Как правило, расщепляющие факторы более распространены или присутствуют в более высоких количествах или обладают более высокой активностью внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких расщепляющих факторов включают: окислительно-восстановительные реагенты, которые подобраны для конкретных субстратов или не обладают субстратной специфичностью, включающие, например, окисляющие или восстанавливающие ферменты или восстановители, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать линкерную группу, расщепляемую при воздействии окислительно-восстановительных реагентов, в результате восстановления; эстеразы; эндосомы или вещества, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые создают pH пять или ниже; ферменты, которые могут вызывать гидролиз или расщепление линкерной группы, расщепляемой в кислотных условиях, действуя как общая кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительна к pH. pH сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как средний внутриклеточный pH немного ниже и колеблется в пределах приблизительно 7,1-7,3. В эндосомах pH более кислый, в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый pH около 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при определенном pH, с высвобождением катионного липида из лиганда внутри клетки или в нужном компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которую расщепляет конкретный фермент. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, являющейся мишенью. Например, лиганд, направленный на печень,

может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают клетки легких, коры почек и яичек.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, могут использоваться для направленной доставки в типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценивать путем тестирования способности расщепляющего реагента (или условия) расщеплять кандидатную линкерную группу. Также будет желательно протестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу на устойчивость к расщеплению в крови или при контакте с другой тканью, не являющейся мишенью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению при первом и втором состояниях, где первое состояние выбирают как показатель расщепления в клетке-мишени, а второе выбирают как показатель расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на интактных животных. Может быть предпочтительным произвести первоначальные оценки в бесклеточных условиях или условиях культуры и подтвердить их последующими оценками на интактных животных. В некоторых вариантах осуществления полезные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) при сравнении с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i. Редокс-расщепляемые линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой редокс-расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером редокс-расщепляемой линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным направляющим средством, можно обратиться к способам, описанным в настоящем документе. Например, кандидата можно оценивать путем инкубирования с дитиотреитолом (ДТТ) или другим восстановителем при использовании реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, наблюдаемую в клетке, например, клетке-мишени. Кандидаты также можно оценивать в условиях, которые подобраны так, чтобы имитировать условия в крови или сыворотке. В одном случае соединения-кандидаты расщепляются не больше чем на 10% в крови. В других вариантах осуществления полезные соединения-кандидаты разрушаются по меньшей мере в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в

100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, подобранных для имитации внутриклеточных условий), чем в крови (или в условиях *in vitro*, подобранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений-кандидатов можно определять с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, подобранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнивать с условиями, подобранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разлагают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются такие ферменты, как фосфатазы в клетках. Примерами линкерных групп на основе фосфата являются $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$, где Rk при каждом появлении может независимо представлять собой C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 аралкил. Иллюстративные варианты осуществления включают $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$ и $-O-P(S)(H)-S-$. В одном варианте осуществления линкерной группой на основе фосфата является $-O-P(O)(OH)-O-$. Эти кандидаты можно оценивать при использовании способов, аналогичных описанным выше.

iii. Линкерные группы, расщепляемые кислотой

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер включает расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислотных условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или с помощью таких агентов, как ферменты, которые могут действовать как общая кислота. В клетке определенные органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду расщепления для расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, без ограничения перечисленными, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. В иллюстративном варианте осуществления атом углерода, присоединенный к атому кислорода сложного эфира (алкоксигруппы), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты можно оценивать при использовании методов, аналогичных описанным выше.

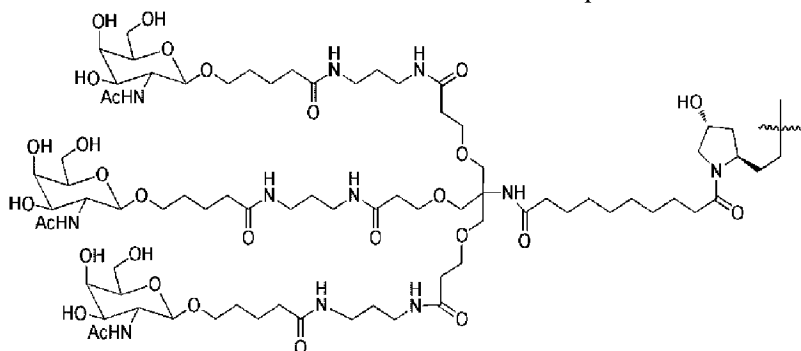
iv. Сложноэфирные линкерные группы

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая сложноэфирная линкерная группа расщепляется в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают, без ограничения, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты можно оценивать при использовании методов, аналогичных описанным выше.

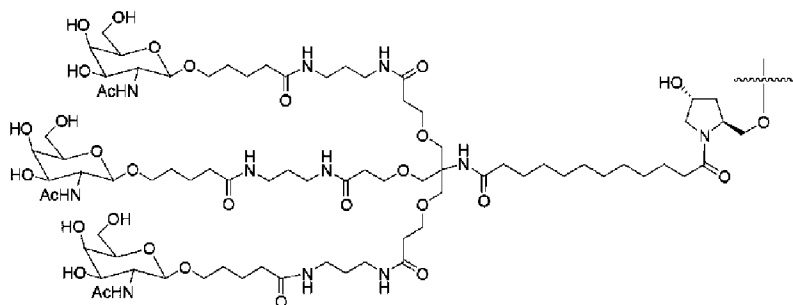
v. Расщепляющие группы на основе пептидов

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида расщепляется такими ферментами, как пептидазы и протеазы, в клетках. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована любым алкиленом, алкениленом или алкинеленом. Пептидная связь является особым типом амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами, с получением пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептидов имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты можно оценивать при использовании методов, аналогичных описанным выше.

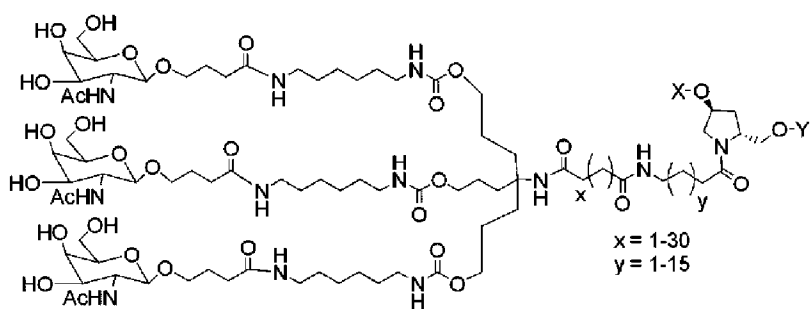
В некоторых вариантах осуществления иРНК согласно изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры иРНК-углеводных конъюгатов с линкерами композиций и способов согласно изобретению включают, без ограничения:



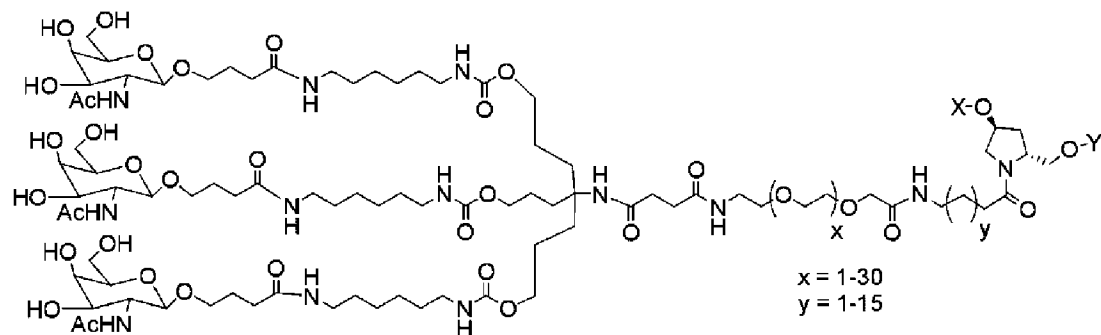
(Формула XXXVII),



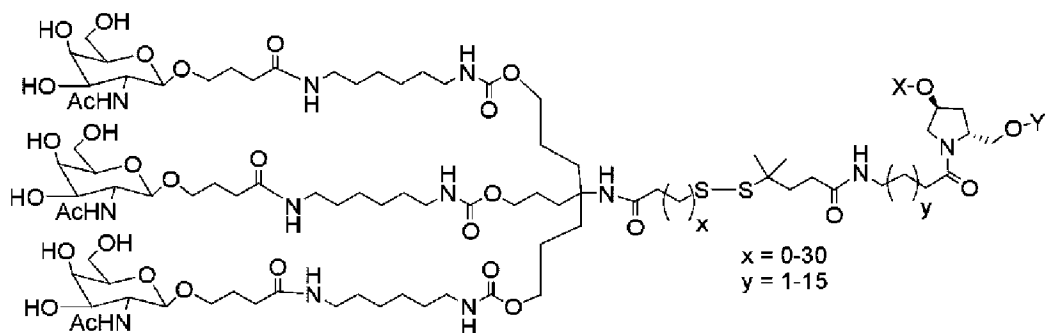
(Формула XXXVIII),



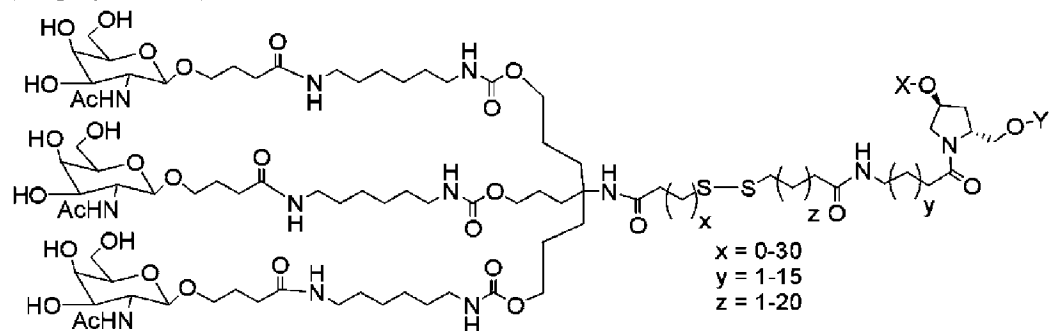
(Формула XXXIX),



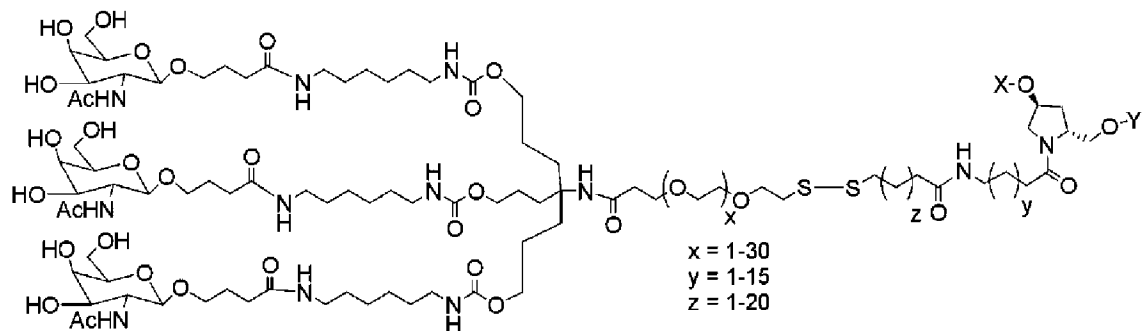
(Формула XL),



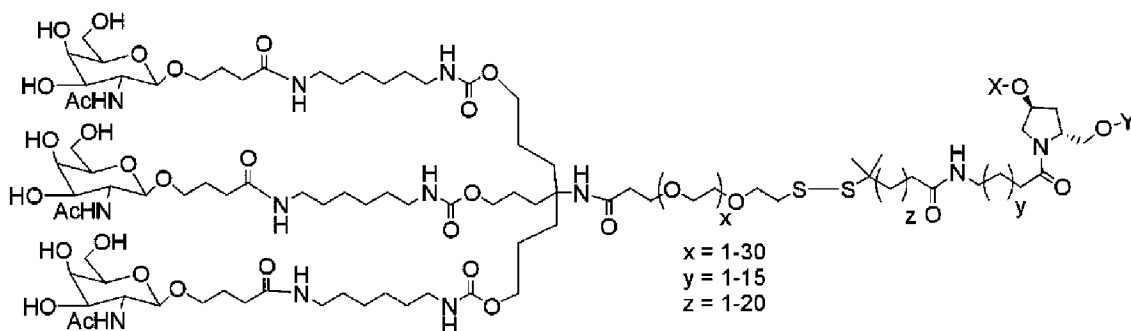
(Формула XLI),



(Формула XLII),



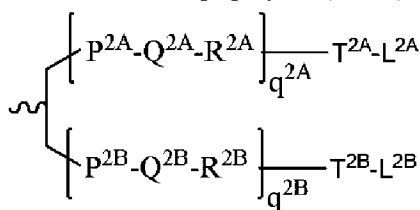
(Формула XLIII), и



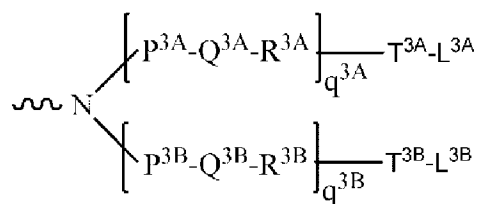
(Формула XLIV), когда один из X или Y является олигонуклеотидом, другой является водородом.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов изобретения лиганд представляет собой одно или больше производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

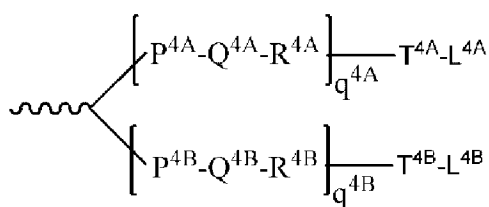
В одном варианте осуществления дцPHK согласно изобретению конъюгирована с бивалентным или тривалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой формуле (XLV)-(XLVI):



Формула XXXXV

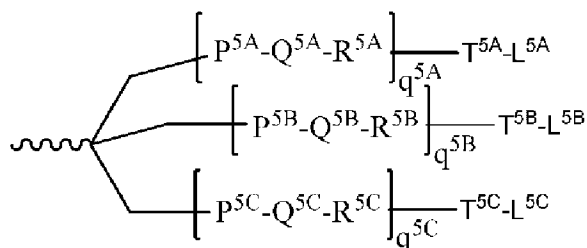


Формула XLVI



Формула XLVII

или



Формула XLVIII

;

где:

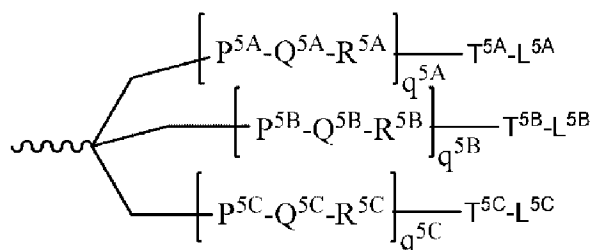
q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, q^{4A}, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} и q^{5C} независимо для каждого случая представляют собой 0-20, и где повторяющееся звено может быть одинаковым или разным; каждый P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или более метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH_2 , $C(O)O$, $C(O)NH$, $NHCH(R^a)C(O)$, $-C(O)-$



L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо для каждого случая моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой боковую цепь аминокислоты или H. Трехвалентное конъюгирование производных GalNAc особенно предпочтительно для использования с РНКи средствами для ингибирования экспрессии гена-мишени, такими как конъюгаты формулы (XLIX):



Формула XLIX

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

Примеры подходящих конъюгатов двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп с производными GalNAc включают, без ограничения, структуры, перечисленные выше в формулах II, VII, XI, X и XIII.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение РНК-конъюгатов, включают, без ограничения перечисленными, патенты США 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646 и 8,106,022, все содержание каждого из которых настоящим включено в настоящий документ посредством отсылки.

Не нужно, чтобы все положения в данном соединении были обязательно одинаково модифицированы, и фактически больше чем одна из вышеуказанных модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК. Настоящее

изобретение также включает иРНК соединения, которые являются химерными соединениями.

"Химерные" иРНК соединения или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой иРНК соединения, в некоторых вариантах осуществления дцРНКи средства, которые содержат две или больше химически различных областей, каждая из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т.е. нуклеотида в случае дцРНК соединения. Такие иРНК обычно содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицирована таким образом, чтобы придавать иРНК повышенную устойчивость к деградации нуклеазами, улучшенный захват клетками или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительная область иРНК может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. Например, РНКазы H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы H приводит к расщеплению РНК-мишени, что значительно повышает эффективность иРНК при ингибировании экспрессии генов. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими иРНК, когда используются химерные дцРНК, по сравнению с фосфоротиоат-дезоксид дцРНК, которые гибридизуются с той же областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени можно обнаруживать стандартным способом с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, с помощью методов гибридизации ассоциированных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях РНК в иРНК может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул был конъюгирован с иРНК для повышения активности, клеточного распределения или клеточного захвата иРНК, и методики для проведения такого конъюгирования доступны в научной литературе. Такие нелигандные фрагменты включают молекулы липидов, таких как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053). et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецильные остатки (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний-1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильную группу (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или молекулу октадециламина или гексиламинокарбонилхлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Репрезентативные патенты США, в которых описано получение таких

конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгирования включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем аминокгруппу подвергают реакции с конъюгируемой молекулой при использовании соответствующих связывающих или активирующих реагентов. Реакцию конъюгирования можно проводить либо с РНК, которая остается связанной с твердой подложкой, либо после снятия РНК в жидкой фазе. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

IV. Доставка иРНК согласно изобретению

Доставка иРНК согласно изобретению в клетку, например, в клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, подверженный риску или имеющий диагноз ассоциированного с кетогексокиназой нарушения), может быть достигнута несколькими различными способами. Например, доставка может быть осуществлена путем контакта клетки с иРНК согласно изобретению *in vitro* или *in vivo*. Доставка *in vivo* также может быть выполнена напрямую путем введения композиции, включающей иРНК, например дцРНК, субъекту. В альтернативе доставка *in vivo* может быть выполнена опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Такие альтернативные варианты дополнительно обсуждаются ниже.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК согласно изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL., (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки). При доставке *in vivo* факторы, которые следует учитывать при доставке молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставленной молекулы в ткани-мишени. РНК-интерференция также продемонстрировала успех при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G. et al., (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH. et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H. и др. (2002) BMC Neurosci., 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004), Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602). Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечивать направленную доставку иРНК в ткань-мишень и позволяет избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы иРНК могут быть модифицированы путем химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для улучшения захвата клетками и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленную против АроВ, конъюгированную с липофильной молекулой холестерина, системно вводили мышам, что привело к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J. et al., (2004) Nature 432:173-178).

В альтернативном варианте осуществления иРНК может быть доставлена с применением систем доставки лекарственных средств, таких как наночастицы, дендример,

полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействие на отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая эффективный захват иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть связаны с иРНК, либо можно вызвать образование из них везикул или мицелл (см., например, Kim SH. et al., (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно препятствует деградации иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК находятся в рамках компетенции специалиста в данной области (см., например, публикации Sorensen, DR., et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN et al., (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, подходящих для системной доставки молекул иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al. (2003), см. выше; Verma, UN. et al., (2003), см. выше), "твердые липидные частицы с нуклеиновой кислотой" (Zimmermann, TS. et al., (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY. et al., (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. et al., (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. et al., (2008) *Pharm. Res.* Aug 16, электронная публикация до выхода в печать; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA. et al., (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. et al., (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США 7,427,605, который полностью включен в настоящий документ посредством отсылки.

А. иРНК согласно изобретению, кодируемые вектором

иРНК, направленная на ген кетогексокиназы, может экспрессироваться с транскрипционных единиц, встроенных в ДНК или РНК векторы (см., например, Couture, A. et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A. et al., международная публикация PCT WO 00/22113, Conrad, международная публикация PCT WO 00/22114, и Conrad, патент США 6,054,299). Экспрессия может быть транзиторной (порядка часов или недель) или стабильной (от недель до месяцев или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегративным или неинтегративным вектором. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы он мог наследоваться в виде внехромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Вирусные векторные системы, которые могут использоваться со способами и композициями, описанными в настоящем документе, включают, без ограничения перечисленными, (а) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе, без

ограничения, лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (с) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (е) векторы на основе SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) папилломавирусные векторы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе вируса оспы, такого как ортопокс, например, векторы на основе вакциновируса или авипокс, например, вируса оспы канареек или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или выпотрошенный аденовирус. Также могут использоваться репликационно-дефектные вирусы. Различные векторы будут включены или не будут включены в геном клеток. При необходимости конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В альтернативе конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. Конструкции для рекомбинантной экспрессии иРНК обычно требуют регуляторных элементов, например промоторов, энхансеров и т.д., для обеспечения экспрессии иРНК в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать в отношении векторов и конструкций, известны в уровне техники.

V. Фармацевтические композиции согласно изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают молекулы иРНК согласно изобретению. В одном варианте осуществления в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, могут применяться при профилактике или лечении ассоциированного с кетогексокиназой нарушения. Такие фармацевтические композиции изготавливают в соответствии со способом доставки. Одним из примеров являются композиции, которые изготовлены для системного введения путем парентеральной доставки, например, подкожной (п/к), внутримышечной (в/м) или внутривенной (в/в) доставки. Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно изобретению являются стерильными. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции согласно изобретению являются апирогенными.

Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы. Как правило, подходящая доза иРНК согласно изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в сутки, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки. Как правило, подходящая доза иРНК согласно изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг или от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,0 мг/кг. Схема введения повторных доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, ежемесячно, один раз в 3-6 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно

одного раза в шесть месяцев.

После начальной схемы лечения процедуры лечения можно проводить реже. Продолжительность лечения может быть определена в зависимости от тяжести заболевания.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть длительно действующей, при этом дозы вводят с интервалами не больше 1, 2, 3 или 4 или более месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно изобретению вводят приблизительно раз в месяц. В других вариантах осуществления изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно изобретению вводят ежеквартально (т.е. примерно раз в три месяца). В других вариантах осуществления изобретения однократную дозу фармацевтических композиций вводят два раза в год (т.е. примерно раз в шесть месяцев).

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что некоторые факторы могут влиять на дозировку и график введения, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, без ограничения, мутации, присутствующие у субъекта, предыдущее лечение, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта профилактически или терапевтически эффективным количеством композиции, в соответствующих случаях, может включать однократное лечение или серию лечений.

иРНК может быть доставлена таким образом, чтобы направленно воздействовать на конкретную ткань (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, без ограничения перечисленными, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из различных компонентов, которые включают, без ограничения перечисленными, предварительно подготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Составы включают такие составы, которые таргетно воздействуют на печень.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, которые могут быть представлены в виде единичной лекарственной форме, могут быть изготовлены в соответствии со стандартными технологиями, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие технологии включают этап объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем(ями) или вспомогательным веществом(ами). Как правило, составы изготавливают путем однородного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями.

А. Дополнительные составы

i. Эмульсии

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и изготовлены в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих

0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, включающие две несмешивающихся жидких фазы, тщательно смешанные и диспергированные друг с другом. Как правило, эмульсии могут относиться к типу вода в масле (в/м) или масло в воде (м/в). Когда водная фаза тонко разделена и диспергирована в виде мельчайших капель в основной масляной фазе, полученная композиция называется эмульсией вода в масле (в/м). В альтернативе, когда масляная фаза тонко распределена и диспергирована в виде мельчайших капель в основной водной фазе, полученная композиция называется эмульсией масло в воде (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты помимо дисперсных фаз, а также активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо само по себе в виде отдельной фазы. Фармацевтические вспомогательные вещества, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также при необходимости могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии могут также представлять собой множественные эмульсии, которые состоят больше чем из двух фаз, как, например, в случае эмульсий масло в воде в масле (м/в/м) и вода в масле в воде (в/м/в). Такие сложные составы часто обеспечивают некоторые преимущества, которых не имеют простые бинарные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные капельки масла в эмульсии м/в заключают в себе мелкие капельки воды, составляют эмульсию в/м/в. Аналогичным образом, система масляных капель, заключенных в глобулы воды, стабилизированные в непрерывной масляной фазе, образует эмульсию м/в/м.

Эмульсии характеризуются малой или нулевой термодинамической стабильностью. Часто дисперсная или дискретная фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в таком виде за счет эмульгаторов или вязкости состава. Другие способы стабилизации эмульсий включают использование эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в широком смысле можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, природные эмульгаторы, абсорбирующие основы и тонкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические сурфактанты, также известные как поверхностно-активные

вещества, нашли широкое применение в составе эмульсий и были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Отношение гидрофильных и гидрофобных свойств поверхностно-активного вещества было названо гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ) и является ценным инструментом для классификации и выбора поверхностно-активных веществ при изготовлении составов. Поверхностно-активные вещества можно подразделить на различные классы в зависимости от природы их гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

В состав эмульсий также включают большое разнообразие неэмульгирующих материалов, которые вносят свой вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажняющие вещества, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Применение эмульсионных составов дерматологическим, пероральным и парентеральным путями и способы их изготовления были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновых кислот изготавливают в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают сначала путем диспергирования масла в водном растворе

поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта с промежуточной длиной цепи, с образованием прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно-чистые дисперсии двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизированы межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M. , Ed., 1989, VCH Publishers, New York, p. 185-215).

iii. Микрочастицы

иРНК согласно настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены с помощью распылительной сушки, но также могут быть получены другими способами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдоожиженном слое, вакуумную сушку или комбинацию этих методов.

iv. Усилители проникновения

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении используются различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности молекул иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только растворимые в липидах или липофильные лекарственные соединения легко проникают через клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проникать через клеточные мембраны, если мембрана, которую нужно пересечь, обработана усилителем проникновения. Помимо улучшения диффузии нелипофильных препаратов через клеточные мембраны, усилители проникновения также повышают проницаемость липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения можно отнести к одной из пяти широких категорий, а именно к поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, комплексообразующим веществам и не образующим комплексов веществам, не обладающим поверхностно-активными свойствами (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из вышеуказанных классов усилителей проникновения и их применение в производстве фармацевтических композиций и доставке фармацевтических средств хорошо известны в уровне техники.

v. Вспомогательные вещества

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "вспомогательное вещество" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее вещество или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым, причем его выбирают с учетом запланированного способа введения, чтобы обеспечить требуемый объем, консистенцию и т.д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной

фармацевтической композиции. Такие вещества хорошо известны в уровне техники.

vi. Другие компоненты

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях, на уровнях их использования, установленных в данной области техники. Так, например, композиции могут содержать дополнительные, совместимые, фармацевтически активные вещества, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные вещества, пригодные для физического изготовления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутняющие вещества, загустители и стабилизаторы. Однако такие вещества при добавлении не должны существенно препятствовать биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы могут быть стерилизованы и, при желании, смешаны со вспомогательными веществами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими веществами, эмульгаторами, солями для изменения осмотического давления, буферами, красителями, вкусовыми добавками или ароматическими веществами и т.п., которые не взаимодействуют нежелательным образом с нуклеиновой кислотой(ами) в составе.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включающие, например, натрий карбоксиметилцеллюлозу, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в изобретении, включают: (а) одну или более иРНК и (b) одно или более средств, которые действуют по механизму, отличному от иРНК, и которые могут применяться для лечения кетогексокиназа-ассоциированного нарушения, например, гипертриглицеридемии.

Токсичность и профилактическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических методов на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, профилактически эффективной у 50% популяции). Отношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как отношение LD50/ED50. Соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные в результате тестов на культурах клеток и в исследованиях на животных, могут использоваться при определении диапазона доз для применения у человека. Доза композиций, представленных в настоящем документе, обычно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, который включает ED50 или ED80, или ED90, с низкой токсичностью или без нее. Доза может варьировать в пределах этого диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути

введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в изобретении, профилактически эффективная доза может быть первоначально оценена по результатам анализов на культурах клеток. Доза может быть определена в моделях на животных для достижения диапазона концентраций циркулирующего соединения в плазме или, при необходимости, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, достижение сниженной концентрации полипептида), который включает IC50 (т.е. концентрация тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов) или более высокие уровни ингибирования, как определено в клеточной культуре. Такая информация может использоваться для более точного определения доз, которые можно применять у человека. Уровни в плазме можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждаемому выше, иРНК, представленные в изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, применяемыми при профилактике или лечении кетогексокиназа-ассоциированного нарушения, например, гипертриглицеридемии. В любом случае лечащий врач может регулировать количество и время введения иРНК в зависимости от результатов, наблюдаемых при использовании стандартных показателей эффективности, известных в данной области или описанных в настоящем документе.

VI. Способы ингибирования экспрессии кетогексокиназы

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования экспрессии гена КГК в клетке. Способы включают контакт клетки с РНКи средством, например, двухцепочечным РНК средством, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии КГК в клетке, осуществляя, таким образом, ингибирование экспрессии КГК в клетке.

Контакт клетки с иРНК, например, двухцепочечным РНК средством, может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Контакт клетки *in vivo* с иРНК включает контакт клетки или группы клеток в организме субъекта, например человека, с иРНК. Также возможны комбинации способов контакта с клеткой *in vitro* и *in vivo*. Контакт с клеткой может быть прямым или косвенным, как обсуждалось выше. Кроме того, контакт с клеткой может осуществляться при посредстве направляющего лиганда, включающего любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления направляющий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, GalNAc-лиганд или любой другой лиганд, который направляет РНКи средство в интересующий участок.

Термин "ингибирование" при использовании в настоящем документе используется попеременно с терминами "снижение", "сайленсинг", "даунрегуляция", "подавление" и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии кетогексокиназы" служит для обозначения ингибирования экспрессии любого гена кетогексокиназы (такого, например, как ген кетогексокиназы мыши, ген кетогексокиназы крысы, ген кетогексокиназы обезьяны или ген

кетогексокиназы человека), а также вариантов или мутантов гена кетогексокиназы. Таким образом, ген кетогексокиназы может быть геном кетогексокиназы дикого типа, мутантным геном кетогексокиназы или трансгенным геном кетогексокиназы в контексте генетически модифицированной клетки, группы клеток или организма.

"Ингибирование экспрессии гена кетогексокиназы" включает любой уровень ингибирования гена кетогексокиназы, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена кетогексокиназы. Экспрессия гена кетогексокиназы может быть оценена по уровню или изменению уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена кетогексокиназы, например, по уровню мРНК кетогексокиназы или уровню белка кетогексокиназы. Этот уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, включающих, например, образец, полученный у субъекта. Следует понимать, что кетогексокиназа экспрессируется преимущественно в печени, но также в головном мозге, желчном пузыре, сердце и почке, и присутствует в кровотоке.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или больше из таких переменных, которые ассоциированы с экспрессией кетогексокиназы, в сравнении с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть контрольный уровень любого типа, который используется в уровне техники, например, исходный уровень перед введением дозы или уровень, определенный у аналогичного субъекта, в клетке или образце, которые не подвергались лечению или подвергались лечению контролем (таким как, например, контроль только буфером или контроль неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно изобретению экспрессия гена кетогексокиназы ингибируется по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%, или до значения ниже уровня обнаружения анализа. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена кетогексокиназы ингибируется по меньшей мере на 70%. Кроме того, следует понимать, что может быть желательным ингибирование экспрессии кетогексокиназы в некоторых тканях, например, в печени, без значимого ингибирования экспрессии в других тканях, например, головном мозге. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа анализа, представленного в Примере 2, с концентрацией миРНК 10 нМ, в линии клеток соответствующих видов.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяют по нокдауну человеческого гена у грызуна, экспрессирующего человеческий ген, например, у AAV-инфицированной мыши, экспрессирующей человеческий ген-мишень (т.е. кетогексокиназу), например, при введении в виде однократной дозы, например 3 мг/кг, при минимальной экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в модельной системе на животных также можно определить, например, после введения однократной дозы, например 3 мг/кг, при минимальной экспрессии РНК. Такие системы могут применяться, когда последовательности нуклеиновых кислот человеческого гена и гена модельного животного достаточно близки, благодаря чему человеческая иРНК

обеспечивает эффективный нокдаун гена модельного животного. Экспрессию РНК в печени определяют с помощью методов ПЦР, представленных в Примере 2.

Ингибирование экспрессии гена кетогексокиназы может проявляться в снижении количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном у субъекта), в которых ген кетогексокиназы транскрибируется, и которые подверглись лечению (например, при контакте клетки или клеток с иРНК согласно изобретению или при введении иРНК согласно изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали), в результате чего экспрессия гена кетогексокиназы ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которые не подверглись такой обработке (контрольные клетки, не обработанные иРНК или не обработанные иРНК, направленно воздействующим на интересующий ген). В некоторых вариантах осуществления ингибирование оценивают способом, представленным в Примере 2, при использовании концентрации миРНК 10 нМ в линии клеток соответствующего вида и выражением уровня мРНК в обработанных клетках в процентах от уровня мРНК в контрольных клетках при использовании следующей формулы:

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

В других вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена кетогексокиназы можно оценивать по снижению параметра, который функционально связан с экспрессией гена кетогексокиназы, например, по уровню белка кетогексокиназы в крови или сыворотке субъекта. Сайленсинг гена кетогексокиназы можно определять в любой клетке, экспрессирующей кетогексокиназу, эндогенно или гетерологично, с экспрессионной конструкцией, и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Ингибирование экспрессии белка кетогексокиназы может проявляться в снижении уровня белка кетогексокиназы, экспрессируемого клеткой или группой клеток в образце субъекта (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном у субъекта). Как было объяснено выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выражено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток, или как изменение уровня белка в исследуемом образце, например, крови или сыворотке, полученной из нее.

Контрольная клетка или группа клеток, или образец субъекта, которые можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы, включает клетку или группу клеток, или образец субъекта, которые еще не подвергались контакту с РНКи средством согласно изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток, или образец субъекта могут быть получены от отдельного субъекта (например, человека или животного) до лечения субъекта РНКи средством или соответствующей контрольной популяции.

Уровень мРНК кетогексокиназы, которая экспрессируется клеткой или группой

клеток, может быть определен при использовании любого известного в данной области способа оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии кетогексокиназы в образце определяют путем обнаружения транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена кетогексокиназы. РНК можно выделять из клеток с использованием методов выделения РНК, включающих, например, экстракцию кислым фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene™ (PreAnalytix™, Switzerland). Типичные форматы анализов с использованием гибридизации рибонуклеиновых кислот, включают ядерные run-on анализы, ОТ-ПЦР, анализы защиты от РНКазы, Нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричный анализ.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии кетогексокиназы определяют с использованием зонда нуклеиновой кислоты. Термин "зонд" при использовании в настоящем документе относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться со специфической кетогексокиназой. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально разработаны для мечения. Примеры молекул, которые могут использоваться в качестве зондов, включают, без ограничения перечисленными, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно использовать в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, помимо прочего, Саузерн- или Нозерн-анализ, анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и матрицы зондов. Один из методов определения уровней мРНК включает контакт выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК кетогексокиназы. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизируют на твердой поверхности и подвергают контакту с зондом, например, путем разгона выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК с геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизируют на твердой поверхности, и мРНК подвергают контакту с зондом(ами), например, в матрице генных чипов Affymetrix®. Квалифицированный специалист может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для использования при определении уровня мРНК кетогексокиназы.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии кетогексокиназы в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или обратную транскриптазу (для получения кДНК), например, мРНК в образце, например, с помощью ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант описан в Mullis, 1987, патент США 4,683,202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), системы амплификации на основе транскрипции (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу катящегося кольца (Lizardi et al., патент США 5,854,033) или любого другого метода амплификации нуклеиновых кислот с последующим

обнаружением амплифицированных молекул с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы обнаружения особенно полезны для обнаружения молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах изобретения уровень экспрессии КГК определяют с помощью количественной флуорогенной ОТ-ПЦР (т.е. системы TaqManTM). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют способом, представленным в Примере 2, при использовании, например, концентрации миРНК 10 нМ в линии клеток соответствующего вида.

Уровни экспрессии мРНК кетогексокиназы можно контролировать с помощью блоттинга на мембране (например, используемого в гибридизационном анализе, таком как Нозерн, Саузерн, дот и т.п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, сфер или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 и 5,445,934, которые включены в настоящий документ посредством отсылки. Определение уровня экспрессии кетогексокиназы также может включать использование зондов на основе нуклеиновых кислот в растворе.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (рДНК) или ПЦР в реальном времени (кПЦР). Применение этих методов ПЦР описано и проиллюстрировано в Примерах, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют способом, представленным в Примере 2, при использовании, например, концентрации миРНК 10 нМ в линии клеток соответствующего вида.

Уровень экспрессии белка КГК можно определять с использованием любого известного в данной области метода измерения уровней белка. Такие методы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлуоресцентный анализ, электрохемилюминесцентный анализ и т.п.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов согласно изобретению оценивают по снижению уровня мРНК или белка КГК (например, в образце биопсии печени).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно изобретению иРНК вводят субъекту таким образом, что иРНК поступает в конкретный участок в организме субъекта. Ингибирование экспрессии кетогексокиназы можно оценивать с помощью измерений уровня или изменения уровня мРНК кетогексокиназы или белка кетогексокиназы в образце, полученном из жидкости или ткани из определенного участка

в организме субъекта (например, печени или крови).

При использовании в настоящем документе термины обнаружение или определение уровня аналита означают проведение стадий для определения присутствия материала, например, белка, РНК. При использовании в настоящем документе методы обнаружения или определения включают обнаружение или определение уровня аналита, который ниже уровня обнаружения для используемого метода.

VII. Способы профилактики и лечения согласно изобретению

В настоящем изобретении также предложены способы применения иРНК согласно изобретению или композиции, содержащей иРНК согласно изобретению, для ингибирования экспрессии кетогексокиназы, с обеспечением предупреждения или лечения кетогексокиназа-ассоциированного нарушения, например, кетогексокиназа-ассоциированного нарушения, выбранного из группы, включающей заболевание печени (например, стеатоз печени, стеатогепатит, в особенности неалкогольный стеатогепатит (НАСГ)), дислипидемию (например, гиперлипидемию, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистое заболевание (например, артериальную гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения проксимальных канальцев, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункцию адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемию, подагру, расстройства пищевого поведения и чрезмерную тягу к сладкому. В способах согласно изобретению клетка может быть подвергнута контакту с миРНК *in vitro* или *in vivo*, т.е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с применением способов согласно изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген кетогексокиназы, например, клетка печени, клетка головного мозга, клетка желчного пузыря, клетка сердца, клетка почки или клетка печени. Клеткой, подходящей для применения в способах согласно изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (такая как человеческая клетка, включая человеческую клетку у химерного животного, не относящегося к человеку, или клетка не относящегося к человеку примата, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), или клетка не примата. В некоторых вариантах осуществления клетка является человеческой клеткой, например, человеческой клеткой печени. В способах согласно изобретению экспрессия кетогексокиназы ингибируется в клетке по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95, или до уровня ниже уровня обнаружения анализа.

Способы *in vivo* согласно изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена кетогексокиназы млекопитающего, которое подлежит введению средства РНКи. Композицию могут вводить

любым способом, известным в уровне техники, в том числе, без ограничения этим, пероральным, внутривенным или парентеральным путями, включая внутримышечное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, воздушное (аэрозольное), назальное, ректальное и наружное (включая трансбуккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят путем внутримышечной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется посредством инъекции депо. Инъекция депо может высвобождать иРНК постоянно в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция депо может позволить снизить частоту введения доз, необходимую для получения требуемого эффекта, например, требуемого ингибирования КГК или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо также может обеспечить более стабильные концентрации в сыворотке. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В некоторых вариантах осуществления инъекция депо является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение производят с помощью насоса. Насос может быть внешним насосом или насосом, имплантируемым хирургическим путем. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантируемый осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос может использоваться для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В некоторых вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой подкожный инфузионный насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой имплантируемый хирургическим путем насос, который доставляет иРНК в печень.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от обрабатываемой области. Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения таргетинга.

В одном аспекте настоящего изобретения также предложены способы ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, включающей дцРНК, направленную на ген кетогексокиназы в клетке млекопитающего, и содержание млекопитающего в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена кетогексокиназы, осуществляя, таким образом, ингибирование экспрессии гена кетогексокиназы в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценивать любыми способами, известными в данной области техники, а также способами, например, кОТ-ПЦР, описанными в настоящем документе, например, в Примере 2. Снижение продукции белка можно оценивать с помощью любых известных из уровня техники методов и методов, например, ИФА. В некоторых вариантах осуществления образец пункционной биопсии печени служит в

качестве тканевого материала для мониторингования снижения экспрессии гена или белка кетогексокиназы. В других вариантах осуществления образец крови служит в качестве образца субъекта для мониторингования снижения экспрессии белка кетогексокиназы.

В настоящем изобретении дополнительно предложены способы лечения нуждающегося в этом субъекта, например, субъекта, у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с кетогексокиназой, такое как заболевание печени (например, стеатоз печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, повышенный уровень холестерина ЛПНП, пониженный уровень холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа), сердечно-сосудистые заболевания (например, артериальная гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения в проксимальных канальцах, хроническое нарушение функции почек), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерная тяга к сладкому.

В настоящем изобретении дополнительно предложены способы профилактики у субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения согласно изобретению включают введение иРНК согласно изобретению субъекту, например, субъекту, у которого может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы, в профилактически эффективном количестве иРНК, направленной на ген кетогексокиназы, или фармацевтической композиции, включающей иРНК, направленную на ген кетогексокиназы.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с кетогексокиназой, выбрано из группы, состоящей из заболевания печени (например, стеатоза печени, стеатогепатита, в особенности неалкогольного стеатогепатита (НАСГ)), дислипидемии (например, гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета 2-го типа), сердечно-сосудистого заболевания (например, артериальной гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев, хронического нарушения функции почек), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерной тяги к сладкому.

иРНКи согласно настоящему изобретению можно вводить в виде "свободной иРНК". Свободную иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. "Голая" иРНК может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может включать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или их любую комбинацию. В одном

варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Значения pH и осмолярности буферного раствора, содержащего иРНК, можно регулировать таким образом, чтобы они подходили для введения субъекту.

В альтернативе иРНК согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав дцРНК.

Субъекты, у которых может быть эффективным снижение или ингибирование экспрессии гена КГК, являются субъектами, предрасположенными или имеющими диагноз КГК-ассоциированного нарушения, такого как, например, нарушение, ассоциированное с кетогексокиназой, выбранное из группы, состоящей из заболевания печени (например, стеатоза печени, стеатогепатита, в особенности неалкогольного стеатогепатита (НАСГ)), дислипидемии (например, гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета 2-го типа), сердечно-сосудистого заболевания (например, артериальной гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев, хронического нарушения функции почек), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерной тяги к сладкому.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, представленной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия гена-мишени кетогексокиназы снижается, например, приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев на дозу. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в 3-6 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления иРНК, пригодные для способов и композиций, представленных в настоящем документе, специфично взаимодействуют с РНК (первичной или процессированной) гена-мишени кетогексокиназы. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с применением иРНК могут быть получены и выполнены, как описано в настоящем документе.

Введение иРНК в соответствии со способами согласно изобретению может приводить к профилактике или лечению нарушения, ассоциированного с кетогексокиназой, например, заболевания печени (например, стеатоза печени, стеатогепатита, в особенности неалкогольного стеатогепатита (НАСГ)), дислипидемии (например, гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета 2-го типа), сердечно-сосудистого заболевания (например, артериальной гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев,

хронического нарушения функции почек), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерной тяги к сладкому.

Субъектам могут вводить терапевтическое количество иРНК, такое как от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят подкожно, т.е. путем подкожной инъекции. Для доставки нужной дозы иРНК субъекту может использоваться одна или больше инъекций. Инъекции могут повторять в течение некоторого периода времени.

Введение могут повторять на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после первичной схемы лечения лечение можно проводить реже. Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят приблизительно от одного раза в месяц до приблизительно одного раза в три месяца или приблизительно от одного раза в три месяца до приблизительно одного раза в шесть месяцев.

В изобретении также предложены способы и применения иРНК средства или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, у которого может быть эффективным снижение и/или ингибирование экспрессии гена КГК, например, у субъекта, страдающего КГК-ассоциированным заболеванием, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими методами, например, с применением известных фармацевтических средств и/или известных терапевтических методов, таких как, например, применяемые в настоящее время для лечения этих нарушений.

Таким образом, в некоторых аспектах изобретения способы, которые включают одно из иРНК средств согласно изобретению, дополнительно включают введение субъекту одного или больше дополнительных терапевтических средств. Средство иРНК и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно применять одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области или описанным в настоящем документе.

В одном варианте осуществления иРНК средство вводят в комбинации с комбинацией эзетимиба/симвастатина (например, Виторином® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)). В одном варианте осуществления пациенту вводят иРНК средство, а затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или наоборот). В другом варианте осуществления иРНК средство и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

Средство иРНК и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции

или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области или описанным в настоящем документе.

VIII. Диагностические критерии и лечение КГК-ассоциированных заболеваний

Диагностические критерии, терапевтические средства и рекомендации для лечения различных КГК-ассоциированных заболеваний представлены ниже.

A. Гиперурикемия

Уровни мочевой кислоты в сыворотке обычно не получают в виде значений клинических лабораторных исследований. Однако гиперурикемия (повышенный уровень мочевой кислоты) связана с рядом заболеваний и состояний, в том числе подагрой, НАЖБП, НАСГ, нарушением обмена веществ, инсулинорезистентностью (не связанной с иммунным ответом на инсулин), сердечно-сосудистыми заболеваниями, гипертонией и диабетом 2-го типа. Ожидается, что снижение экспрессии КГК может быть эффективным для профилактики или лечения одного или более состояний, связанных с повышенным уровнем мочевой кислоты в сыворотке крови. Кроме того, ожидается, что субъект получит клиническую пользу от нормализации уровней мочевой кислоты в сыворотке в направлении или до нормального уровня мочевой кислоты в сыворотке, например, не больше 6,8 мг/дл или не больше 6 мг/дл, даже в отсутствие явных признаков или симптомов одного или более состояний, связанных с повышенным уровнем мочевой кислоты.

Модели гиперурикемии на животных включают, например, рацион с высоким содержанием фруктозы, например, у крыс и мышей, что может вызывать одно или больше из накопления жира, включая стеатоз печени, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа, ожирение, включая висцеральное ожирение, метаболический синдром, пониженную секрецию адипонектина, сниженную функцию почек и воспаление (см., например, Johnson et al. (2013) *Diabetes*. 62:3307-3315). Введение оксоновой кислоты, ингибитора уриказы, также можно применять для индукции гиперурикемии (см., например, Mazalli et al. (2001) *Hypertens*. 38:1101-1106). Генетические модели гиперурикемии включают мышей B6;129S7-Uox^{tm1Bay}/J, которых можно приобрести в Jackson Laboratory ([/jaxmice.jax.org/strain/002223.html](http://jaxmice.jax.org/strain/002223.html)) и у которых развивается гиперурикемия с 10-кратным превышением уровней мочевой кислоты в сыворотке крови.

В уровне техники известны различные способы лечения гиперурикемии. Однако некоторые из средств могут применяться лишь в ограниченных группах пациентов. Например, аллопуринол является ингибитором ксантиноксидазы, который применяется для снижения уровня мочевой кислоты в сыворотке крови при лечении ряда состояний, например, подагры, сердечно-сосудистых заболеваний, включая ишемическое и реперфузионное повреждение, гипертензию, атеросклероз и инсульт, а также воспалительных заболеваний (Pacher et al., (2006) *Pharma.Rev.*58:87-114). Однако применение аллопуринола противопоказано пациентам с нарушением функции почек, например, с хроническим заболеванием почек, гипотиреозом, гиперинсулинемией или инсулинорезистентностью; или у субъектов, предрасположенных к заболеванию почек или нарушению функции почек, например, у субъектов с артериальной гипертензией,

нарушением обмена веществ, диабетом и у пожилых лиц. Кроме того, аллопуринол не следует принимать субъектам, принимающим пероральные коагулянты или пробенцид, а также субъектам, принимающим диуретики, в особенности тиазидные диуретики или другие лекарственные средства, которые могут снижать функцию почек или обладать потенциальной нефротоксичностью.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации с другими композициями и способами для лечения гиперурикемии, например, аллопуринолом, оксипуринолом, фебуксостатом. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют для лечения субъектов со сниженной функцией почек или предрасположенных к снижению функции почек, например, вследствие возраста, сопутствующих заболеваний или лекарственных взаимодействий.

В. Подагра

Подагрой страдает примерно 1 из 40 взрослых, чаще всего мужчины в возрасте 30-60 лет. Женщин подагра поражает реже. Подагра - одна из нескольких форм артрита, при которой с помощью лечения можно избежать повреждения суставов в будущем. Подагра характеризуется повторяющимися приступами острого воспалительного артрита, вызванного воспалительной реакцией на кристаллы мочевой кислоты в суставе вследствие гиперурикемии, возникающей в результате недостаточного почечного клиренса мочевой кислоты или избыточной продукции мочевой кислоты. Подагра, ассоциированная с фруктозой, иногда связана с вариантами переносчиков, экспрессируемых в почках, кишечнике и печени. Подагра характеризуется образованием и отложением тофусов, кристаллов моноурата натрия (МУН), в суставах и подкожно. Боль, связанная с подагрой, не связана с размером тофусов, а является результатом иммунного ответа на кристаллы МУН. Существует линейная обратная зависимость между мочевой кислотой в сыворотке крови и скоростью уменьшения размера тофусов. Например, в одном исследовании 18 пациентов с нетофусной подагрой уровень мочевой кислоты в сыворотке снизился до 2,7-5,4 мг/дл (0,16-0,32 мМ) у всех субъектов в течение 3 месяцев после начала уратопонижающей терапии (Pascual and Sivera (2007) Ann. Rheum. Dis. 66:1056-1058). Однако потребовалось 12 месяцев после нормализации уровня мочевой кислоты в сыворотке, чтобы кристаллы МУН исчезли из асимптоматических коленных или первых плюснефаланговых суставов у пациентов с подагрой в течение менее 10 лет, в сравнении с 18 месяцами у пациентов с подагрой более 10 лет. Таким образом, эффективное лечение подагры не требует полного удаления тофусов или разрешения всех симптомов, например, боли и отека в суставах, воспаления, а просто уменьшения по меньшей мере одного признака или симптома подагры, например, уменьшения тяжести или частоты приступов подагры в сочетании со снижением уровня уратов в сыворотке крови.

Модели подагры на животных включают гиперурикемию, индуцированную оксоновой кислотой (см., например, Jang et al. (2014) Mycobiology. 42:296-300).

Доступные в настоящее время методы лечения подагры противопоказаны или

неэффективны для ряда субъектов. Аллопуринол, стандартная терапия первой линии для снижения уровня мочевой кислоты у пациентов с подагрой, противопоказан в ряде групп пациентов, особенно при нарушенной функции почек, как обсуждалось выше. Кроме того, у некоторых субъектов лечение аллопуринолом не эффективно, например, у субъектов, которые страдают приступами подагры, несмотря на лечение, или субъектов, которые страдают сыпью или реакциями гиперчувствительности, связанными с аллопуринолом.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации с другими средствами для снижения уровня мочевой кислоты в сыворотке крови. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации со средствами для лечения симптомов подагры, например, анальгетиками или противовоспалительными средствами, например, НПВС. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют для лечения субъектов со сниженной функцией почек или предрасположенных к снижению функции почек, например, вследствие возраста, сопутствующих заболеваний или лекарственных взаимодействий.

С. Заболевание печени

НАЖБП связана с гиперурикемией (Xu et al. (2015) J. Hepatol. 62:1412-1419), которая, в свою очередь, связана с повышенным метаболизмом фруктозы. Определение неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) требует: (а) наличия признаков стеатоза печени либо по результатам визуализационного исследования, либо гистологического исследования, и (б) отсутствия причин вторичного накопления жира в печени, таких как значительное употребление алкоголя, применение стеатогенных лекарственных препаратов или наследственные заболевания. У большинства пациентов НАЖБП связана с метаболическими факторами риска, такими как ожирение, сахарный диабет и дислипидемия. НАЖБП гистологически подразделяется на неалкогольную жировую печень (НАЖП) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). НАЖП определяется как наличие изолированного стеатоза печени без признаков гепатоцеллюлярного повреждения в виде баллонирования гепатоцитов. НАСГ определяется как наличие стеатоза печени и воспаления с повреждением гепатоцитов (баллонной дистрофией), с фиброзом или без (Chalasani et al. (2012) Hepatol. 55:2005-2023). Принято считать, что у пациентов с простым стеатозом гистологическое прогрессирование происходит очень медленно, если вообще наблюдается, тогда как у пациентов с НАСГ может наблюдаться гистологическое прогрессирование до цирротической стадии заболевания. В нескольких исследованиях были представлены результаты долгосрочного наблюдения пациентов с НАЖБП и НАСГ. Их выводы можно резюмировать следующим образом: (а) у пациентов с НАЖБП повышена общая смертность по сравнению с соответствующими контрольными группами, (б) наиболее частой причиной смерти у пациентов с НАЖБП, НАЖП и НАСГ являются сердечно-сосудистые заболевания, и (с) у пациентов с НАСГ (но не с НАЖП) регистрируется повышенная смертность, связанная с нарушением функции печени.

Животные модели НАЖБП включают различные модели на животных, получающих

корм с высоким содержанием жира или фруктозы. Генетические модели НАЖБП включают мышей B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J и B6.129S4-Pten^{tm1Hwu}/J, которых можно приобрести в The Jackson Laboratory.

Лечение НАЖБП обычно направлено на контроль состояний, приведших к развитию НАЖБП. Например, пациентов с дислипидемией лечат средствами для нормализации уровня холестерина или триглицеридов, при необходимости, с целью лечения или предотвращения дальнейшего прогрессирования НАЖБП. Пациентов с сахарным диабетом 2-го типа лечат препаратами для нормализации ответа на глюкозу или чувствительности к инсулину. Изменения образа жизни, например, изменения питания и физической нагрузки, также используются для лечения НАЖБП. В модели НАЖБП на мышах лечение аллопуринолом предотвращало развитие стеатоза печени, а также значительно уменьшало уже развившийся стеатоз печени у мышей (Xu et al., J. Hepatol. 62:1412-1419, 2015).

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяются в комбинации с другими средствами для снижения уровня мочевой кислоты сыворотки крови. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяются в комбинации со средствами для лечения симптомов НАЖБП. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяются для лечения субъектов со сниженной функцией почек или предрасположенных к снижению функции почек, например, вследствие возраста, сопутствующих заболеваний или лекарственных взаимодействий.

Д. Дислипидемия, нарушения гликемического контроля, метаболический синдром и ожирение

Дислипидемия (например, гиперлипидемия, повышенный холестерин ЛПНП, пониженный холестерин ЛПВП, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет 2-го типа), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение и чрезмерная тяга к сладкому связана с повышенным метаболизмом фруктозы. Характеристики или диагностические критерии таких состояний приведены ниже. Модели нарушения обмена веществ на животных и компоненты включают различные модели на животных, получающих корм с высоким содержанием жира или фруктозы. Генетические модели включают мышей с дефицитом лептина B6.Cg-Lep^{ob}/J, широко известных как мыши *ob* или *ob/ob*, которые можно приобрести в The Jackson Laboratory.

Нормальные и отклоняющиеся от нормы уровни липидов натошак представлены в таблице ниже.

Липид	Значение	Интерпретация
Общий холестерин	Ниже 200 мг/дл	Желательный
	200-239 мг/дл	Верхняя граница
	240 мг/дл и выше	Высокий
Холестерин ЛПНП	Ниже 70 мг/дл	Лучшее значение для людей с болезнью

		сердца или диабетом.
	Ниже 100 мг/дл	Оптимальное значение для людей с риском болезни сердца.
	100-129 мг/дл	Близкое к оптимальному значение при отсутствии болезни сердца. Высокий в случае присутствия болезни сердца.
	130-159 мг/дл	Верхняя граница при отсутствии болезни сердца. Высокое значение в случае присутствия болезни сердца.
	160-189 мг/дл	Высокий при отсутствии болезни сердца. Очень высокое значение в случае присутствия болезни сердца.
	190 мг/дл и выше	Очень высокий
Холестерин ЛПВП	Ниже 40 мг/дл (мужчины) Ниже 50 мг/дл (женщины)	Пониженный
	50-59 мг/дл	Умеренно низкий
	60 мг/дл и выше	Нормальный
Триглицериды	Ниже 150 мг/дл	Желательный
	150-199 мг/дл	Верхняя граница
	200-499 мг/дл	Высокий
	500 мг/дл и выше	Очень высокий

Постпрандиальная гипертриглицеридемия преимущественно возникает при повышенной продукции или сниженном катаболизме богатых триглицеридами липопротеинов (TRL) и является следствием предрасполагающих генетических вариаций и патологических состояний, таких как инсулинорезистентность и ожирение.

Инсулинорезистентность характеризуется наличием по меньшей мере одного из:

1. Уровень глюкозы в крови натощак 100-125 мг/дл при двух измерениях в разное время; или
2. Пероральный тест на толерантность к глюкозе с уровнем глюкозы 140-199 мг/дл, полученным через 2 часа после приема глюкозы внутрь.

При использовании в настоящем документе инсулинорезистентность не включает отсутствие ответа на инсулин в результате иммунного ответа на введенный инсулин, что часто наблюдается на поздних стадиях инсулинозависимого диабета, в особенности диабета 1-го типа.

Диабет 2-го типа характеризуется по меньшей мере одним из следующего:

1. Уровень глюкозы в крови натощак >126 мг/дл при двух измерениях в разное время;
2. Анализ на гемоглобин A1c (A1C) с результатом >6,5% и выше; или
3. Пероральный тест на толерантность к глюкозе с уровнем глюкозы >200 мг/дл, полученным через 2 часа после приема глюкозы внутрь.

Фармакологическое лечение диабета 2-го типа и инсулинорезистентности включает лечение средствами для нормализации уровня сахара в крови, такими как метформин

(например, глюкофаж, глюметза), производные сульфонилмочевины (например, глибурид, глипизид, глимепирид), меглитиниды (например, репаглинид, натеглинид), тиазолидиндионы (например, тиазолидиндионы (розиглитазон, пиоглитазон), ингибиторы ДПП-4 (ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин), антагонисты рецепторов ГПП-1 (эксенатид, лираглутид) и ингибиторы SGLT2 (например, канаглифлозин, дапаглифлозин).

Ожирение характеризуется как болезнь с чрезмерным накоплением жира в организме. Индекс массы тела (ИМТ), который рассчитывается путем деления массы тела в килограммах (кг) на рост в метрах (м) в квадрате, дает адекватную оценку жировых отложений для большинства, но не для всех людей. Как правило, ИМТ ниже 18,5 характеризуется недостаточным весом, от 18,5 до 24,9 - нормальный, 25,0-29,9 - избыточный вес, 30,0-34,9 - ожирение (I степень), 35-39,9 - ожирение (II степень), 40,0 и выше - крайняя степень ожирения (III степень).

Способы оценки подкожного жира по сравнению с висцеральным жиром представлены, например, в публикации Wajchenberg (2000) Subcutaneous and visceral adipose Fabric: its ratio to the Metaball Syndrome, Endocr Rev. 21:697-738, которая включена в настоящее описание посредством отсылки.

Метаболический синдром характеризуется группой состояний, определяемых присутствием по меньшей трех из пяти следующих факторов метаболического риска:

1. Широкая талия (>35 дюймов (90 см) у женщин или >40 дюймов (100 см) у мужчин);
2. Высокий уровень триглицеридов (>150 мг/дл);
3. Низкий уровень холестерина ЛПВП (<50 мг/дл у женщин или <40 мг/дл у мужчин);
4. Повышенное артериальное давление (>130/85) или прием гипотензивных препаратов; а также
5. Высокий уровень сахара в крови натощак (>100 мг/дл) или прием гипогликемических препаратов.

Как и при НАЖБП, средства для лечения метаболического синдрома зависят от присутствующих специфических факторов риска, например, нормализуют уровень липидов при отклонении уровня липидов от нормы, нормализуют ответ на глюкозу или чувствительность к инсулину при отклонении от нормы.

Метаболический синдром, инсулинорезистентность и диабет 2-го типа часто связаны со снижением функции почек или потенциальным снижением функции почек.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для лечения субъектов с дислипидемией, нарушениями гликемического контроля, метаболическим синдромом и ожирением. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с метаболическим синдромом, инсулинорезистентностью или диабетом 2-го типа и хроническим нарушением функции почек. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы предназначены для

применения у субъектов с метаболическим синдромом, инсулинорезистентностью или диабетом 2-го типа, которые страдают одним или больше сердечно-сосудистыми заболеваниями, гипотиреозом или воспалительными заболеваниями; или у пожилых субъектов (например, старше 65 лет). В некоторых вариантах осуществления композиции и способы предназначены для применения у субъектов с метаболическим синдромом, инсулинорезистентностью или диабетом 2-го типа, которые также принимают лекарственное средство, которое может снижать функцию почек, как указано в инструкции по применению лекарственного средства. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с метаболическим синдромом, инсулинорезистентностью или диабетом 2-го типа, которые принимают пероральные коагулянты или пробенцид. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с метаболическим синдромом, инсулинорезистентностью или диабетом 2-го типа, которые принимают диуретики, особенно тиазидные диуретики.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации с другими средствами для снижения уровня мочевой кислоты в сыворотке крови. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации со средствами для лечения симптомов метаболического синдрома, инсулинорезистентности или диабета 2-го типа. В некоторых вариантах осуществления субъекты получают, например, средства для снижения артериального давления, например, диуретики, бета-блокаторы, ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина II, блокаторы кальциевых каналов, альфа-блокаторы, антагонисты альфа-2-адренорецепторов, комбинированные альфа- и бета-блокаторы, агонисты центральных адренорецепторов, ингибиторы периферических адренорецепторов и вазодилататоры; средства для снижения уровня холестерина, например, статины, селективные ингибиторы абсорбции холестерина, смолы или гиполипидемические препараты; или средства для нормализации уровня сахара в крови, например, метформин, сульфонилмочевины, меглитиниды, тиазолидиндионы, ингибиторы DPP-4, антагонисты рецепторов ГПП-1 и ингибиторы SGLT2.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют для лечения субъектов со сниженной функцией почек или предрасположенных к снижению функции почек, например, вследствие возраста, сопутствующих заболеваний или лекарственных взаимодействий.

иРНК и дополнительные терапевтические средства можно вводить одновременно или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или в разное время, или другим способом, известным в данной области или описанным в настоящем документе.

Е. Сердечно-сосудистое заболевание

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для лечения субъектов с сердечно-сосудистыми

заболеваниями. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием и хроническим нарушением функции почек. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием, которые страдают одним или более из нарушения обмена веществ, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, диабета, гипотиреоза или воспалительного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием, которые также принимают лекарственное средство, которое может снижать функцию почек, как указано на инструкции по применению лекарственного средства. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием, которые принимают пероральные коагулянты или пробенцид. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием, которые принимают диуретики, в особенности тиазидные диуретики. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению предназначены для применения у субъектов с сердечно-сосудистым заболеванием, у которых лечение аллопуринолом оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации с другими средствами для снижения уровня мочевой кислоты в сыворотке крови. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению применяют в комбинации со средствами для лечения симптомов сердечно-сосудистого заболевания, например, средствами для снижения артериального давления, например, диуретиками, бета-блокаторами, ингибиторами АПФ, блокаторами рецепторов ангиотензина II, блокаторами кальциевых каналов, альфа-блокаторами, антагонистами альфа-2-адренорецепторов, комбинированными альфа- и бета-блокаторами, агонистами центральных адренорецепторов, ингибиторами периферических адренергических рецепторов и вазодилататорами; или средствами для снижения уровня холестерина, например, статинами, селективными ингибиторами абсорбции холестерина, смолами или препаратами, снижающими уровень липидов.

F. Заболевание почек

Заболевание почек включает, например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения в проксимальных канальцах и хроническое нарушение функции почек.

Острая почечная недостаточность возникает, когда почки внезапно теряют способность фильтровать продукты жизнедеятельности из крови, что приводит к накоплению опасных уровней отходов в сыворотке крови и системному химическому дисбалансу. Острая почечная недостаточность может развиваться быстро, в течение нескольких часов или дней, и чаще всего встречается у лиц, которые уже

госпитализированы, особенно у лиц в критическом состоянии, нуждающихся в интенсивной терапии. Острая почечная недостаточность может приводить к смерти и требует интенсивной терапии. Впрочем, острая почечная недостаточность может быть обратимой. Если в остальном у пациента удовлетворительное состояние здоровья, у него может восстановиться нормальная или почти нормальная функция почек.

Хроническая болезнь почек, также называемая хронической почечной недостаточностью, описывает постепенную потерю функции почек. Когда хроническая болезнь почек достигает поздней стадии, в организме могут накапливаться опасные уровни жидкости, электролитов и отходов. Признаки и симптомы заболевания почек могут включать тошноту, рвоту, потерю аппетита, утомляемость и слабость, нарушения сна, изменение диуреза, снижение мыслительных способностей, мышечные судороги и спазмы, икоту, отек стоп и лодыжек, стойкий зуд, боль в груди, если жидкость скапливается вокруг оболочки сердца, одышка, если жидкость скапливается в легких, высокое артериальное давление (гипертензию), которое трудно контролировать. Признаки и симптомы хронической болезни почек часто неспецифичны, могут развиваться медленно и могут не проявляться, пока не произойдет необратимое повреждение.

Болезнь почек лечат путем удаления повреждающего фактора или состояния, вызывающего повреждение почек, например, нормализации артериального давления для улучшения функции почек, прекращения лечения препаратами, которые могут вызывать повреждение почек, уменьшения воспаления, вызывающего повреждение почек, или обеспечения поддержки почек (например, гемодиализа) для улучшения функции почек.

Функцию почек обычно определяют с помощью одного или больше показателей стандартных лабораторных исследований, АМК (азота мочевины крови), креатинина (крови), креатинина (мочи) или клиренса креатинина (см., например, www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003435.htm). Такие исследования также могут быть информативными для диагностики состояний в других органах.

Как правило, уровень АМК от 6 до 20 мг/дл считается нормальным, хотя нормальные значения могут отличаться в разных лабораториях. Повышенный уровень мочевины может свидетельствовать о заболевании почек, включая гломерулонефрит, пиелонефрит и острый тубулярный некроз или почечную недостаточность.

Нормальный результат для креатинина крови составляет от 0,7 до 1,3 мг/дл у мужчин и от 0,6 до 1,1 мг/дл у женщин. Повышенный уровень креатинина в крови может свидетельствовать о нарушении функции почек из-за повреждения или недостаточности почек, инфекции или снижения кровотока.

Значения креатинина мочи (суточная проба) могут изменяться от 500 до 2000 мг/день. Результаты зависят от возраста и количества безжировой массы тела. Нормальные результаты составляют от 14 до 26 мг на кг массы тела в день у мужчин.

И от 11 до 20 мг на кг массы тела в сутки у женщин. Отклоняющиеся от нормы результаты могут указывать на повреждение почек, такое как повреждение клеток канальцев, почечная недостаточность, снижение притока крови к почкам или почечная

инфекция (пиелонефрит).

Определение клиренса креатинина помогает получить информацию о функции почек путем сравнения уровня креатинина в моче с уровнем креатинина в крови. Клиренс часто измеряется в миллилитрах в минуту (мл/мин). Нормальные значения составляют от 97 до 137 мл/мин у мужчин и от 88 до 128 мл/мин у женщин. Клиренс креатинина ниже нормы может свидетельствовать о повреждении почек, например, повреждении клеток канальцев, почечной недостаточности, снижении притока крови к почкам или снижении клубочковой фильтрации в почках.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно изобретению могут применяться для лечения заболевания почек. Предполагается, что такие средства не будут вызывать повреждения почек.

VIII. Наборы

В некоторых аспектах настоящего изобретение обеспечивает наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав миРНК соединения, например, двухцепочечного миРНК соединения или оциРНК соединения (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может быть процессировано с образованием оциРНК соединения, или ДНК, которая кодирует миРНК соединение, например, двухцепочечное соединение миРНК или оциРНК соединение или их предшественник).

Такие наборы включают одно или более дцРНК средств и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества дцРНК средства (средств). ДцРНК средство может находиться во флаконе или предварительно наполненном шприце. Наборы необязательно могут дополнительно включать приспособления для введения дцРНК средства (например, устройство для инъекций, такое как предварительно наполненный шприц) или приспособления для измерения ингибирования КГК (например, приспособления для измерения ингибирования мРНК КГК, белка КГК и/или активности КГК). Такие приспособления для измерения ингибирования КГК могут включать приспособления для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы крови. Наборы согласно изобретению могут дополнительно включать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтического состава могут быть предоставлены в одном контейнере, например, во флаконе или предварительно наполненном шприце. В альтернативе может быть желательным предоставить компоненты фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата миРНК соединения и, по меньшей мере, другой контейнер для соединения-носителя. Набор может быть упакован в нескольких различных конфигурациях, например, один или больше контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии

со способом, описанным в настоящем документе, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. В набор также может входить устройство доставки.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует считать ограничивающими. Полное содержание всех ссылок, патентов и опубликованных заявок на патент, цитируемых в настоящей заявке, а также неофициальный Список последовательностей и Фигуры включены в настоящий документ посредством отсылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез иРНК

Источник реагентов

Если источник реагента в настоящем документе не указан конкретно, такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Конструкция миРНК

Молекулы миРНК, направленные на ген кетогексокиназы (КГК) человека, "изоформу X10 кетогексокиназы" (человек: NCBI refseqID XM_017004061.1; NCBI GeneID: 3795), были сконструированы при использовании собственных скриптов R и Python. Человеческая мРНК XM_017004061 REFSEQ, версия 1, имеет длину 2283 оснований. Подробные списки немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей КГК показаны в Таблицах 2 и 4. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей кетогексокиназы показаны в Таблицах 3 и 5.

Следует понимать, что по всему тексту настоящей заявки название дуплекса без десятичного знака эквивалентно названию дуплекса с десятичным знаком, который просто относится к номеру партии дуплекса. Например, AD-959917 эквивалентно AD-959917.1.

Синтез миРНК

миРНК синтезировали и отжигали с использованием стандартных методов, известных в данной области.

Вкратце, последовательности миРНК синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с использованием фосфорамидитной химии на твердой подложке. Твердая подложка представляла собой стекло с порами заданного размера (500Å), нагруженное специальным лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F и 2'-O-метил РНК и дезоксифосфорамидиты были приобретены в Thermo-Fisher (Milwaukee, WI) и HONGGENE (China). 2'-F 2'-O-Метил, ГНК (гликольнуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и другие модификации вводили при использовании соответствующих фосфорамидитов. Синтез 3'-GalNAc конъюгированных одиночных цепей проводили на GalNAc модифицированной CPG подложке. Для синтеза антисмысловых одиночных цепей использовали специальную универсальную твердую подложку CPG. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин при использовании 5-этилтио-1Н-тетразола (ЭТТ) в

качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи создавали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Wilmington, MA, USA)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 по объему). Время окисления 3 минуты. Все последовательности синтезировали с конечным удалением DMT группы ("без DMT").

После окончания твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды снимали с твердой подложки и удаляли защитные группы в закрытых 96-луночных планшетах с использованием 200 мкл водных реагентов метиламина при 60°C в течение 20 минут. Для последовательностей, содержащих 2'-рибо остатки (2'-ОН), которые защищены трет-бутилдиметилсилильной группой (TBDMS), снятие защиты во второй стадии проводили с использованием реагента ТЭА·3НF (тригидрофторида триэтиламина). К раствору метиламина для снятия защиты добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и 300 мкл реагента ТЭА·3НF, и инкубировали раствор еще в течение 20 минут при 60°C. В конце стадии снятия и удаления защиты планшет для синтеза оставляли нагреваться до комнатной температуры и осаждали добавлением 1 мл смеси ацетонитрила:этанола (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 часов, супернатант осторожно удаляли с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотида ресуспендировали в 20 мМ буфере NaOAc и обессоливали с использованием 5 мл эксклюзионной колонки HiTrap (GE Healthcare) на системе очистки АКТА, оборудованной автодозатором А905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы каждой последовательности анализировали с помощью ЖХ-МС для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения и отобранного набора образцов с помощью ИЕХ-хроматографии для определения чистоты.

Отжиг отдельных цепей проводили на роботе для работы с жидкими образцами Тесан. Эквимольную смесь смысловых и антисмысловых одиночных цепей объединяли и отжигали в 96-луночных планшетах. После объединения комплементарных одиночных цепей 96-луночный планшет плотно закрывали и нагревали в термостате при 100°C в течение 10 минут, а затем медленно доводили до комнатной температуры в течение 2-3 часов. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали до 10 мкМ в 1× PBS, а затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

Пример 2. Методы скрининга *in vitro*

Культура клеток и трансфекции в 384-луночном формате

Клетки Нер3b (ATCC, Manassas, VA) выращивали почти до конfluence при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в минимальной основной среде Игла (Gibco) с добавкой 10% FBS (ATCC) перед снятием с планшета путем трипсинизации. Трансфекцию проводили путем добавления 5 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax в каждую лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, номер по кат. 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса миРНК в отдельную лунку в 384-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После этого к смеси миРНК добавляли 40 мкл минимальной питательной среды Игла (ATCC номер по кат. 30-2003), содержащей ~5×10³

клеток Нер3В. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при 10 нМ.

Выделение суммарной РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS (InvitrogenTM, номер по кат: 610-12)

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 при использовании DYNABEAD (Invitrogen, номер по кат. 61012). Вкратце, в планшет с клетками добавляли 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных частиц. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, затем магнитные частицы собирали и удаляли супернатант. Связанную на гранулах РНК затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и один раз промывочным буфером В. Затем гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, снова захватывали и удаляли супернатант.

Синтез кДНК с использованием набора для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, номер по кат. 4368813)

Мастер-микс, содержащий 1,2 мкл 10× буфера, 0,48 мкл 25× dNTP, 1,2 мкл случайных праймеров, 0,6 мкл обратной транскриптазы, 0,6 мкл ингибитора РНКазы и 7,92 мкл H₂O на каждую реакцию добавляли на лунку. Планшеты закрывали, перемешивали и затем инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре с последующим инкубированием при 37°C в течение 2 часов.

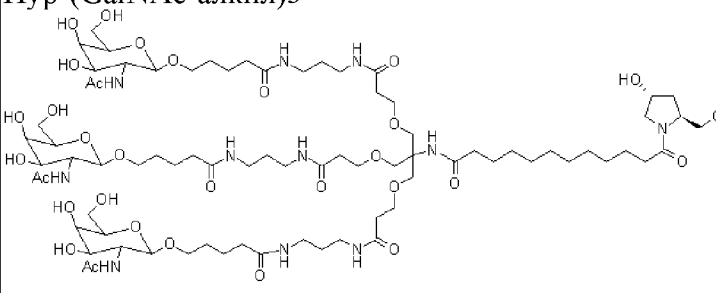
ПЦР в реальном времени

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл TaqMan зонда к GAPDH человека (4326317E), 0,5 мкл человеческого зонда КГК (Hs01071998_m1) и 5 мкл мастер-микса зонда Lightcycler 480 (Roche, номер по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (номер по каталогу Roche 04887301001). ПЦР в реальном времени проводили в системе ПЦР в реальном времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали не менее двух раз, и данные нормализовали к клеткам, трансфицированным нецелевой контрольной миРНК. Для расчета относительного кратного изменения, данные в реальном времени анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали по анализам, проведенным с клетками, трансфицированными нецелевой контрольной миРНК.

Результаты скрининга однократной дозы дцРНК средств в Таблицах 2 и 3 показаны в Таблице 6, а результаты скрининга однократной дозы дцРНК средств Таблиц 4 и 5 показаны в Таблице 7.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые для представления последовательностей нуклеиновых кислот. Следует понимать, что эти мономеры, в случае их присутствия в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат

Af	2'-фторадеозин-3'-фосфат
Afs	2'-фторадеозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин -3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладеозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладеозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L10	N-(холестерилкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol)
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3  $C_{78}H_{138}N_{11}O_{31}$ Exact Mass: 1724.9550 Mol. Wt.: 1725.9854
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (абазическая 2'-ОМе фураноза)

Y44	инвертированная абазическая ДНК (2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	Аденозин-гликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	Цитидин-гликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	Гуанозин-гликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидин-гликоль нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
P	Фосфат
VP	Финил-фосфонат
dA	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфоротиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфоротиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфоротиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфоротиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфоротиоат
(C2p)	цитидин-2'-фосфат
(G2p)	гуанозин-2'-фосфат
(U2p)	уридин-2'-фосфат
(A2p)	аденозин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Ahd)	2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфат
(Ghd)	2'-О-гексадецил-гуанозин-3'-фосфат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК средств к кетогексокиназе

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1
AD-251799.1	UUCUCUUUGCAUUCUCGAGAU	41	133-153	AUCUCGAGAAUGCAAAGAGAAAA	110	131-153
AD-253006.1	CCUGCGUUGUGCAGACUCUAU	42	1748-1768	AUAGAGTCUGCACAACGCAGGGC	111	1746-1768
AD-251816.1	AGAUCGCUUAGCCGCGCUUUA	43	150-170	UAAAGCGCGGCUAAGCGAUCUCG	112	148-170
AD-251798.1	UUUCUCUUUGCAUUCUCGAGA	44	132-152	UCUCGAGAAUGCAAAGAGAAAAU	113	130-152
AD-251855.1	GUGAGUCCAUCUGACAAGCGA	45	189-209	UCGCUUGUCAGAUGGACUCACAG	114	187-209
AD-252223.1	CCAACUCCUGCACCUGUUCUCU	46	653-673	AGAGAACGGUGCAGGAGUUGGAC	115	651-673
AD-252530.1	CUUGUAUGGUCGUGUGAGGAA	47	1017-1037	UUCUCACACGACCAUACAAGCC	116	1015-1037
AD-252341.1	GAUCCACAUUGAGGGCCGGAA	48	792-812	UUCGGGCCCUCAAUGUGGAUCCA	117	790-812
AD-252484.1	GCUGUUUGGCUACGGAGACGU	49	930-950	ACGUCUCCGUAGCCAAACAGCUG	118	928-950
AD-253313.1	CUGCCAUUUAAUAGCUGCAU	50	2139-2159	AUGCAGCUAAUAAAUGGCAGAU	119	2137-2159
AD-252117.1	GAGAAGCAGAUCCUGUGCGUU	51	529-549	AACGCACAGGAUCUGCUUCUCUU	120	527-549
AD-251856.1	UGAGUCCAUCUGACAAGCGAU	52	190-210	AUCGCUTGUCAGAUGGACUCACA	121	188-210
AD-251808.1	CAUUCUCGAGAUCCGUUAGCU	53	142-162	AGCUAAGCGAUCUCGAGAAUGCA	122	140-162
AD-251857.1	GAGUCCAUCUGACAAGCGAGU	54	191-211	ACUCGCTUGUCAGAUGGACUCAC	123	189-211
AD-252378.1	AAGAUGCUGCAGCGGAUAGAU	55	829-849	AUCUAUCCGCUGCAGCAUCUUA	124	827-849
AD-251809.1	AUUCUCGAGAUCCGUUAGCCU	56	143-163	AGGCUAAGCGAUCUCGAGAAUGC	125	141-163
AD-251886.1	GCUGAGAAGUGGGAGGCGUUU	57	220-240	AAACGCCUCCACUUCUCAGCCU	126	218-240
AD-252381.1	AUGCUGCAGCGGAUAGACGCA	58	832-852	UGCGUCTAUCCGCUGCAGCAUCU	127	830-852
AD-251800.1	UCUCUUUGCAUUCUCGAGAUU	59	134-154	AAUCUCGAGAAUGCAAAGAGAAA	128	132-154
AD-251801.1	CUCUUUGCAUUCUCGAGAUU	60	135-155	AGAUCUCGAGAAUGCAAAGAGAA	129	133-155
AD-253132.1	UGGAGCCCACCUUGGAAUUA	61	1940-1960	UUAUUCCAAGGUGGGCUCCAAG	130	1938-1960
AD-252146.1	CCUGGUGGACAAGUACCCUAA	62	576-596	UUAGGGTACUUGUCCACCAGGCU	131	574-596
AD-251811.1	UCUCGAGAUCCGUUAGCCGCU	63	145-165	AGCGGCTAAGCGAUCUCGAGAAU	132	143-165
AD-251858.1	AGUCCAUCUGACAAGCGAGGA	64	192-212	UCCUCGCUUGUCAGAUGGACUCA	133	190-212
AD-252483.1	AGCUGUUUGGCUACGGAGACU	65	929-949	AGUCUCCGUAGCCAAACAGCUGG	134	927-949
AD-252380.1	GAUGCUGCAGCGGAUAGACGU	66	831-851	ACGUCUAUCCGCUGCAGCAUCUU	135	829-851
AD-253310.1	AAUCUGCCAUUUAAUAGCUU	67	2136-2156	AAGCUAAUUAAAUGGCAGAUUUU	136	2134-2156

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1
AD-251807.1	GCAUUCUCGAGAU CGCUUAGU	68	141-161	ACUAAGCGAUCUCGAGAAUGCAA	137	139-161
AD-252531.1	UUGUAUGGUCGUGUGAGGAAA	69	1018-1038	UUUCCUCACACGACCAUACAAGC	138	1016-1038
AD-252376.1	UGAAGAUGCUGCAGCGGAUUAU	70	827-847	AUAUCCGCGUGCAGCAUCUUCACC	139	825-847
AD-252715.1	CUGCAGGGCUUUGAUGGCAUU	71	1258-1278	AAUGCCAUCAAGCCCUGCAGGC	140	1256-1278
AD-252490.1	UGGCUACGGAGACGUGGUGUU	72	936-956	AACACCACGUCUCCGUAGCCAAA	141	934-956
AD-252377.1	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	73	828-848	UCUAUCCGCGUGCAGCAUCUUCAC	142	826-848
AD-252628.1	AGCUGGAGACACCUUCAUGU	74	1152-1172	ACAUUGAAGGUGUCUCCAGCUCC	143	1150-1172
AD-252486.1	UGUUUGGCUACGGAGACGUGU	75	932-952	ACACGUCUCCGUAGCCAAACAGC	144	930-952
AD-251806.1	UGCAUUCUCGAGAU CGCUUAU	76	140-160	AUAAGCGAUCUCGAGAAUGCAA	145	138-160
AD-251817.1	GAUCGCUUAGCCGCGCUUUA	77	151-171	UUAAGCGCGGCUAAGCGAUCUC	146	149-171
AD-253083.1	GCCCAACGACCGUGUAUUUGA	78	1853-1873	UCAAUUCACAGGCUUGGUGGCGAG	147	1851-1873
AD-252498.1	AGACGUGGUGUUUGUCAGCAA	79	945-965	UUGCUGACAAACACCACGUCUCC	148	943-965
AD-252379.1	AGAUGCUGCAGCGCAUAGACU	80	830-850	AGUCUATCCGUGCAGCAUCUUC	149	828-850
AD-252118.1	AGAAGCAGAUCCUGUGCGUGU	81	530-550	ACACGCACAGGAUCUGCUUCUCU	150	528-550
AD-252529.1	GCUUGUAUGGUCGUGUGAGGA	82	1016-1036	UCCUCACACGACCAUACAAGCCC	151	1014-1036
AD-251810.1	UUCUCGAGAU CGCUUAGCCGU	83	144-164	ACGGCUAAGCGAUCUCGAGAAUG	152	142-164
AD-252314.1	UGAGAAGGUUGAUCUGACCCA	84	762-782	UGGGUCAGAUCAACCUUCUCAA	153	760-782
AD-251805.1	UUGCAUUCUCGAGAU CGCUUA	85	139-159	UAAGCGAUCUCGAGAAUGCAAAG	154	137-159
AD-253008.1	UGCGUUGUGCAGACUCUAUUU	86	1750-1770	AAAUAGAGUCUGCACAACGCAGG	155	1748-1770
AD-252222.1	UCCAACUCCUGCACCGUUCUU	87	652-672	AAGAACGGUGCAGGAGUUGGACG	156	650-672
AD-251815.1	GAGAU CGCUUAGCCGCGCUUU	88	149-169	AAAGCGCGGCUAAGCGAUCUCGA	157	147-169
AD-252485.1	CUGUUUGGCUACGGAGACGUU	89	931-951	AACGUCTCCGUAGCCAAACAGCU	158	929-951
AD-252627.1	GAGCUGGAGACACCUUCAUUU	90	1151-1171	AAUUGAAGGUGUCUCCAGCUCCC	159	1149-1171
AD-251885.1	GGCUGAGAAGUGGGAGGCGUU	91	219-239	AACGCCTCCCACUUCUCAGCCUU	160	217-239
AD-252497.1	GAGACGUGGUGUUUGUCAGCA	92	944-964	UGCUGACAAACACCACGUCUCCG	161	942-964
AD-252116.1	AGAGAAGCAGAUCCUGUGCGU	93	528-548	ACGCACAGGAUCUGCUUCUCUUC	162	526-548
AD-251797.1	UUUUCUCUUUGCAUUCUCGAU	94	131-151	AUCGAGAAUGCAAAGAGAAAUG	163	129-151
AD-253133.1	GGAGCCCACCUUGGAAUUAU	95	1941-1961	AUUAAUTCCAAGGUGGGCUCCAA	164	1939-1961
AD-251804.1	UUUGCAUUCUCGAGAU CGCUU	96	138-158	AAGCGATCUCGAGAAUGCAAAGA	165	136-158

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1
AD-252600.1	CUCCACUCGGAUGCUUUCCCU	97	1105-1125	AGGGAAAGCAUCCGAGUGGAGCA	166	1103-1125
AD-252528.1	GGCUUGUAUGGUCGUGUGAGU	98	1015-1035	ACUCACACGACCAUACAAGCCCC	167	1013-1035
AD-252450.1	GGCUACGGAGACGUGGUGUUU	99	798-818	AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA	168	796-818
AD-252313.1	UUGAGAAGGUUGAUCUGACCU	100	761-781	AGGUCAGAUCAACCUUCUCAAAG	169	759-781
AD-253134.1	GAGCCCACCUUGGAAUUAAGU	101	1942-1962	ACUUAATUCCAAGGUGGGCUCCA	170	1940-1962
AD-252543.1	CUUGUCUGUGCCUGGGCUGAU	102	1048-1068	AUCAGCCCAGGCACAGACAAGCA	171	1046-1068
AD-251802.1	UCUUUGCAUUCUCGAGAU CGU	103	136-156	ACGAUCTCGAGAAUGCAAAGAGA	172	134-156
AD-252666.1	GCAGGAAGCACUGAGAUUCGU	104	1209-1229	ACGAAUCUCAGUGCUUCCUGCAC	173	1207-1229
AD-251812.1	CUCGAGAU CGCUUAGCCGCGU	105	146-166	ACGCGGCUAAGCGAUCUCGAGAA	174	144-166
AD-252632.1	GGAGACACCUUCAU GCCUCU	106	1156-1176	AGAGGCAUUGAAGGUGUCUCCAG	175	1154-1176
AD-251803.1	CUUUGCAUUCUCGAGAU CGCU	107	137-157	AGCGAUCUCGAGAAUGCAAAGAG	176	135-157
AD-252339.1	UGGAUCCACAUUGAGGGCCGU	108	790-810	ACGGCCCUCAAUGUGGAUCCACU	177	788-810
AD-252285.1	CUGCCAGAUGUGUCUGCUACA	109	736-756	UGUAGCAGACACAUCUGGCAGGC	178	734-756

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК средств к кетогексокиназе

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-251799.1	ususcucuUfuGfCfAfuucucgagauL96	179	asUfscucg (Agn) gaaugcAfaAfgag aasasa	248	UUUUCUCUUUGCAUUCUCGAGAU	317
AD-253006.1	cscsugcgUfuGfUfGfcagacucuauL96	180	asUfsagag (Tgn) cugcacAfaCfpga gsgsc	249	GCCUGCGUUGUGCAGACUCUAU	318
AD-251816.1	asgsaucgCfuUfAfGfccgcgcuuuaL96	181	usAfsaagc (Ggn) cggcuaAfgCfgau cuscsg	250	CGAGAU CGCUUAGCCGCGCUUUA	319
AD-251798.1	ususcucuUfuUfGfCfauucucgagaL96	182	usCfsucga (Ggn) aaugcaAfaGfaga aasasu	251	AUUUUCUCUUUGCAUUCUCGAGA	320
AD-251855.1	gsusgaguCfcAfUfCfugacaagcgaL96	183	usCfsgcuu (Ggn) ucagauGfgAfcuc acsasg	252	CUGUGAGUCCAUCUGACAAGCGA	321
AD-252223.1	cscsaacuCfcUfGfCfaccguuccuL96	184	asGfsagaa (Cgn) ggugcaGfgAfguu ggsasc	253	GUCCAACUCCUGCACCGUUCUCU	322
AD-252530.1	csusuguaUfgGfUfCfugugaggaL96	185	usUfscuc (Agn) cacgacCfaUfaca agscsc	254	GGCUUGUAUGGUCGUGUGAGGAA	323
AD-252341.1	gsasuccaCfaUfUfGfagggccggaL96	186	usUfscgg (Cgn) ccucaaUfgUfgga ucscsa	255	UGGAUCCACAUUGAGGGCCGGAA	324
AD-252484.1	gsusuguUfgGfCfUfacggagacguL96	187	asCfsgucu (Cgn) cguagcCfaAfaca gcsusg	256	CAGCUGUUUGGCUACGGAGACGU	325
AD-253313.1	csusgccaUfuUfAfAfuuagcugcauL96	188	asUfsgcag (Cgn) uaaauaAfaUfggc agsasu	257	AUCUGCCAUUUAAUAGCUGCAU	326
AD-252117.1	gsasgaagCfaGfAfUfccugugcgauL96	189	asAfscgca (Cgn) aggaucUfgCfuuc ucsusu	258	AAGAGAAGCAGAUCCUGUGCGUG	327
AD-251856.1	usgsagucCfaUfCfUfgacaagcgauL96	190	asUfscgcu (Tgn) gucagaUfgGfacu cscsa	259	UGUGAGUCCAUCUGACAAGCGAG	328
AD-251808.1	csasuucuCfGfAfGfAfucgcuuagcuL96	191	asGfscuaa (Ggn) cgaucuCfGfAfgaa ugscsa	260	UGCAUUCUCGAGAU CGCUUAGCC	329
AD-251857.1	gsasguccAfuCfUfGfacaagcgaguL96	192	asCfsucgc (Tgn) ugucagAfuGfgac ucsasc	261	GUGAGUCCAUCUGACAAGCGAGG	330
AD-252378.1	asasgaugCfuGfCfAfgcggauagauL96	193	asUfscuaa (Cgn) cgcugcAfgCfauc uuscscsa	262	UGAAGAUGCUGCAGCGGAUAGAC	331

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-251809.1	asusucucGfaGfAfUfcgcuuagc cuL96	194	asGfsgcua (Agn) gcgaucUfcGfaga ausgsc	263	GCAUUCUCGAGAUCGCUUAGCCG	332
AD-251886.1	gscsugagAfaGfUfGfggaggcg uL96	195	asAfsacgc (Cgn) ucccacUfuCfuca gscsu	264	AGGCUGAGAAGUGGGAGGCGUUG	333
AD-252381.1	asusgcugCfaGfCfGfgauagacg caL96	196	usGfscguc (Tgn) auccgcUfgCfagc auscsu	265	AGAUGCUGCAGCGGAUAGACGCA	334
AD-251800.1	uscsucuuUfgCfAfUfucucgaga uL96	197	asAfsucuc (Ggn) agaauGfAfaga gasasa	266	UUUCUCUUUGCAUUCUCGAGAUC	335
AD-251801.1	csuscuuuGfcAfUfUfcucgagau cuL96	198	asGfsaucu (Cgn) gagaauGfcAfaag agsasa	267	UUCUCUUUGCAUUCUCGAGAUCG	336
AD-253132.1	usgsgagcCfcAfCfCfuuggaau aaL96	199	usUfsaauu (Cgn) caagguGfgGfcuc casag	268	CUUGGAGCCCACCUUGGAAUUA	337
AD-252146.1	cscsugguGfgAfCfAfaguacccu aaL96	200	usUfsaggg (Tgn) acuuguCfcAfcca ggscsu	269	AGCCUGGUGGACAAGUACCCUAA	338
AD-251811.1	uscsucgaGfaUfCfGfcuuagccg cuL96	201	asGfscggc (Tgn) aagcgaUfcUfcga gasasu	270	AUUCUCGAGAUCGCUUAGCCGCG	339
AD-251858.1	asgsuccaUfcUfGfAfcaagcgag gaL96	202	usCfscucg (Cgn) uugucaGfaUfgga cuscga	271	UGAGUCCAUCUGACAAGCGAGGA	340
AD-252483.1	asgscuguUfuGfGfCfuacggaga cuL96	203	asGfsucuc (Cgn) guagccAfaAfcag cusgsg	272	CCAGCUGUUUGGCUACGGAGACG	341
AD-252380.1	gsasugcuGfcAfGfCfGfgauagac guL96	204	asCfsgucu (Agn) uccgcuGfcAfgca ucsusu	273	AAGAUGCUGCAGCGGAUAGACGC	342
AD-253310.1	asasucugCfcAfUfUfuaauuagc uL96	205	asAfsgcua (Agn) uaaaauGfgCfaga uusus	274	AAAAUCUGCCAUUUAAUAGCUG	343
AD-251807.1	gscsauucUfcGfAfGfaucgcuua guL96	206	asCfsuaag (Cgn) gaucucGfaGfaau gcsasa	275	UUGCAUUCUCGAGAUCGCUUAGC	344
AD-252531.1	ususguauGfgUfCfGfugugagga aaL96	207	usUfsuccu (Cgn) acacgaCfcAfuac aasgsc	276	GCUUGUAUGGUCGUGUGAGGAAA	345
AD-252376.1	usgsaagaUfgCfUfGfGfcagcgau auL96	208	asUfsaucc (Ggn) cugcagCfaUfcuu cascsc	277	GGUGAAGAUGCUGCAGCGGAUAG	346
AD-252715.1	csusgcagGfgCfUfUfugauggca uL96	209	asAfsugcc (Agn) ucaaagCfcCfugc agsgsc	278	GCCUGCAGGGCUUUGAUGGCAUC	347

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-252490.1	usgsgcuaCfgGfAfGfacgugguguuL96	210	asAfscacc (Agn) cgucucCfgUfagccasasa	279	UUUGGCUACGGAGACGUGGUGUU	348
AD-252377.1	gsasagauGfcUfGfCfagcggauagaL96	211	usCfsuauC (Cgn) gcugcaGfcAfucucsasc	280	GUGAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	349
AD-252628.1	asgscuggAfgAfCfAfccuucaauguL96	212	asCfsauug (Agn) agguguCfuCfcagcuscsc	281	GGAGCUGGAGACACCUUCAAUGC	350
AD-252486.1	usgsuuugGfcUfAfCfggagacguL96	213	asCfsacgu (Cgn) uccguaGfcCfaaacasgsc	282	GCUGUUUGGCUACGGAGACGUGG	351
AD-251806.1	usgscauuCfuCfGfAfgaucgcuuauL96	214	asUfsaagC (Ggn) aucucgAfgAfaugcasasa	283	UUUGCAUUCUCGAGAU CGCUUAG	352
AD-251817.1	gsasucgcUfuAfGfCfcgcgcuuuaaL96	215	usUfsaaaag (Cgn) gcgguAfaGfcgaucsusc	284	GAGAU CGCUUAGCCGCGCUUUA	353
AD-253083.1	gscscacCfaGfCfCfugugauuuL96	216	usCfsaaaC (Cgn) acagguCfGfugggcsasg	285	CUGCCCCACCAGCCUGUGAUUUGA	354
AD-252498.1	asgsacguGfgUfGfUfuugucagcaL96	217	usUfsgcug (Agn) caaacaCfCfCgucuscsc	286	GGAGACGUGGUGUUUGUCAGCAA	355
AD-252379.1	asgsaugcUfgCfAfGfCfCggaugacuL96	218	asGfsucua (Tgn) ccgcuCfCfCfCggaugacuL96	287	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGACG	356
AD-252118.1	asgsaagCfAfUfCfCfCgugugcuL96	219	asCfsacgc (Agn) caggauCfuGfcuucuscsc	288	AGAGAAGCAGAUCCUGUGCGUGG	357
AD-252529.1	gscsuuguAfuGfGfUfcgugugagaL96	220	usCfscuca (Cgn) acgaccAfuAfcaagcscsc	289	GGGCUUGUAUGGUCGUGUGAGGA	358
AD-251810.1	ususcucgAfgAfUfCfCgcuuagccguL96	221	asCfsggcu (Agn) agcgauCfuCfCggaasusg	290	CAUUCUCGAGAU CGCUUAGCCGC	359
AD-252314.1	usgsagaaGfgUfUfGfaucugaccalL96	222	usGfsgguc (Agn) gaucaaCfCfUfucucasasa	291	UUUGAGAAGGUUGAU CUGACCCA	360
AD-251805.1	usugscauUfcUfCfGfagaucgcuuaL96	223	usAfsagcg (Agn) ucucgaGfaAfugcaasasg	292	CUUUGCAUUCUCGAGAU CGCUUA	361
AD-253008.1	usgscguuGfuGfCfAfgacucuaauL96	224	asAfsauag (Agn) gucugCfCfAfacgcasgsg	293	CCUGCGUUGUGCAGACUCUAUUC	362
AD-252222.1	uscscaacUfcCfUfGfCfCfCgcuucuuL96	225	asAfsgaac (Ggn) gugcagGfaGfuuggascsg	294	CGUCCAACUCCUGCACCUGUUCUC	363

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-251815.1	gsasgaucGfcUfUfAfgccgcgcuuL96	226	asAfsagcg (Cgn) ggcuaaGfcGfaucucsgsa	295	UCGAGAUCGCUUAGCCGCGCUUU	364
AD-252485.1	csusguuuGfgCfUfAfcggagacg uuL96	227	asAfsagcg (Tgn) ccguagCfcAfaac agscsu	296	AGCUGUUUGGCUACGGAGACGUG	365
AD-252627.1	gsasgcugGfaGfAfCfaccucaa uuL96	228	asAfsuuga (Agn) ggugucUfcCfagc ucscsc	297	GGGAGCUGGAGACACCUUCAUG	366
AD-251885.1	gsgscugaGfaAfGfUfgggaggcg uuL96	229	asAfsagcg (Tgn) cccacuUfcUfcag ccsusu	298	AAGGCUGAGAAGUGGGAGGCGUU	367
AD-252497.1	gsasgacgUfgGfUfGfuugucag caL96	230	usGfscuga (Cgn) aaacacCfaCfugc ucscsg	299	CGGAGACGUGGUGUUUGUCAGCA	368
AD-252116.1	asgsagaaGfcAfGfAfuccugugc guL96	231	asCfsgcac (Agn) ggauCuGfcUfucucusc	300	GAAGAGAAGCAGAUCCUGUGCGU	369
AD-251797.1	ususuucuCfuUfUfGfcauucug auL96	232	asUfscgag (Agn) augcaaAfgAfgaa aasusg	301	CAUUUUCUCUUUGCAUUCUCGAG	370
AD-253133.1	gsgsagccCfaCfCfUfuggaaua auL96	233	asUfsuaau (Tgn) ccaaggUfgGfgcu ccsasa	302	UUGGAGCCCACCUUGGAAUUAAG	371
AD-251804.1	usugcaUfuCfUfCfagagucgc uuL96	234	asAfsagcg (Tgn) cucgagAfaUfgca aasgsa	303	UCUUUGCAUUCUCGAGAUCGCUU	372
AD-252600.1	csusccacUfcGfGfAfugcuuucc cuL96	235	asGfsggaa (Agn) gcauccGfaGfugg agscsa	304	UGCUCACUCGGAUGCUUUCGCG	373
AD-252528.1	gsgscuugUfaUfGfGfucguguga guL96	236	asCfsucac (Agn) cgaccaUfaCfaag ccscsc	305	GGGGCUUGUAUGGUCGUGUGAGG	374
AD-252450.1	gsgscuacGfgAfGfAfcguggugu uuL96	237	asAfsacac (Cgn) acgucuCfcGfuag ccsasa	306	UUGGCUACGGAGACGUGGUGUUU	375
AD-252313.1	usugagaAfgGfUfUfgaucugac cuL96	238	asGfsguca (Ggn) aucaacCfuUfcuc aasasg	307	CUUUGAGAAGGUUGAUCUGACCC	376
AD-253134.1	gsasgcccAfcCfUfUfggaauaa guL96	239	asCfsuuaa (Tgn) uccaagGfuGfggc ucscsa	308	UGGAGCCCACCUUGGAAUUAAGG	377
AD-252543.1	csusugucUfgUfGfCfcugggcug auL96	240	asUfscagc (Cgn) caggcaCfaGfaca agscsa	309	UGCUUGUCUGUGCCUGGGCUGAG	378
AD-251802.1	uscuuugCfaUfUfCfucgagau guL96	241	asCfsgauc (Tgn) cgagaaUfgCfaaa gasgsa	310	UCUCUUUGCAUUCUCGAGAUCGC	379

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-252666.1	gscsaggaAfgCfAfCfugagauucguL96	242	asCfsgaau(Cgn)ucagugCfuUfccu gcsasc	311	GUGCAGGAAGCACUGAGAUUCGG	380
AD-251812.1	csuscgagAfuCfGfCfuagccgcguL96	243	asCfsgcgg(Cgn)uaagcgAfuCfucg agsasa	312	UUCUCGAGAU CGCUUAGCCGCGC	381
AD-252632.1	gsgsagacAfcCfUfUfcaaugccu cuL96	244	asGfsaggc(Agn)uugaagGfuGfucuccsasg	313	CUGGAGACACCUUCA AUGCCUCC	382
AD-251803.1	csusuugcAfuUfCfUfcgagaucgcuL96	245	asGfscgau(Cgn)ucgagaAfuGfcaag asg	314	CUCUUUGCAUUCUCGAGAU CGCU	383
AD-252339.1	usgsgaucCfaCfAfUfugagggccguL96	246	asCfsggcc(Cgn)ucaaugUfgGfauc cascsu	315	AGUGGAUCCACAUUGAGGGCCGG	384
AD-252285.1	csusgccaGfaUfGfUfgucugcua caL96	247	usGfsuagc(Agn)gacacaUfcUfggc agsgsc	316	GCCUGCCAGAUGUGUCUGCUACA	385

Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК средств к кетогексокиназе

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в ХМ_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в ХМ_017004061.1
AD-253536.1	UUCUCUUUGCAUUCUCGAGAU	41	133-153	ATCUCGAGAAUGCAAAGAGAAAA	422	131-153
AD-254743.1	CCUGCGUUGUGCAGACUCUAU	42	1748-1768	ATAGAGTCUCCACAACGCAGGGC	423	1746-1768
AD-253553.1	AGAUCGCUTAGCCGCGCUUUA	386	150-170	UAAAGCGCGGCTAAGCGAUCUCG	424	148-170
AD-253535.1	UUUCUCUUTGCAUUCUCGAGA	387	132-152	UCUCGAGAAUGCAAAGAGAAAAU	113	130-152
AD-253592.1	GUGAGUCCAUCUGACAAGCGA	45	189-209	UCGCTUGUCAGAUGGACUCACAG	425	187-209
AD-253960.1	CCAACUCCTGCACCGUUCUCU	388	653-673	AGAGAACGGUGCAGGAGUUGGAC	115	651-673
AD-254267.1	CUUGUAUGGUCGUGUGAGGAA	47	1017-1037	UTCCTCACACGACCAUACAAGCC	426	1015-1037
AD-254078.1	GAUCCACATUGAGGGCCGGAA	389	792-812	UTCCGGCCCUCAATGUGGAUCCA	427	790-812
AD-254216.1	GCUGUUUGGCTACGGAGACGU	390	930-950	ACGUCUCCGUAGCCAAACAGCUG	118	928-950
AD-255050.1	CUGCCAUUTAAUUAGCUGCAU	391	2139-2159	ATGCAGCUAAUTAAAUGGCAGAU	428	2137-2159
AD-253854.1	GAGAAGCAGATCCUGUGCGUU	392	529-549	AACGCACAGGATCTGCUUCUCUU	429	527-549
AD-253593.1	UGAGUCCATCTGACAAGCGAU	393	190-210	ATCGCUTGUCAGATGGACUCACA	430	188-210
AD-253545.1	CAUUCUCGAGAU CGCUUAGCU	53	142-162	AGCUAAGCGAUCUCGAGAAUGCA	122	140-162
AD-253594.1	GAGUCCAUCUGACAAGCGAGU	54	191-211	ACUCGCTUGUCAGAUGGACUCAC	123	189-211
AD-254115.1	AAGAUGCUGCAGCGGAUAGAU	55	829-849	ATCUAUCCGCUGCAGCAUCUUCA	431	827-849
AD-253546.1	AUUCUCGAGATCGCUUAGCCU	394	143-163	AGGCTAAGCGATCTCGAGAAUGC	432	141-163
AD-253623.1	GCUGAGAAGUGGGAGGCGUUU	57	220-240	AAACGCCUCCCACTUCUCAGCCU	433	218-240
AD-254118.1	AUGCUGCAGCGGAUAGACGCA	58	832-852	UGCGTCTAUCCGCTGCAGCAUCU	434	830-852
AD-253537.1	UCUCUUUGCATUCUCGAGAUU	395	134-154	AAUCTCGAGAATGCAAAGAGAAA	435	132-154
AD-253538.1	CUCUUUGCAUTCUCGAGAUUCU	396	135-155	AGAUCUCGAGAAUGCAAAGAGAA	129	133-155
AD-254869.1	UGGAGCCCACCUUGGAAUUAA	61	1940-1960	UTAATUCCAAGGUGGGCUCCAAG	436	1938-1960
AD-254065.1	CCCAGUUCAAGUGGAUCCACA	397	779-799	UGUGGATCCACTUGAACUGGGUC	437	777-799
AD-253883.1	CCUGGUGGACAAGUACCCUAA	62	576-596	UTAGGGTACUUGUCCACCAGGCU	438	574-596
AD-253548.1	UCUCGAGATCGCUUAGCCGCU	398	145-165	AGCGGCTAAGCGATCUCGAGAAU	439	143-165
AD-253595.1	AGUCCAUCTGACAAGCGAGGA	399	192-212	UCCUCGCUUGUCAGAUGGACUCA	133	190-212
AD-254215.1	AGCUGUUUGGCUACGGAGACU	65	929-949	AGUCTCCGUAGCCAAACAGCUGG	440	927-949

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1
AD-254117.1	GAUGCUGCAGCGGAUAGACGU	66	831-851	ACGUCUAUCCGCUGCAGCAUCUU	135	829-851
AD-255047.1	AAUCUGCCAUUAUUAGCUU	400	2136-2156	AAGCTAAUUAUUGGCAGAUUUU	441	2134-2156
AD-253544.1	GCAUUCUCGAGAU CGCUUAGU	68	141-161	ACUAAGCGAUCTCGAGAAUGCAA	442	139-161
AD-254268.1	UUGUAUGGTCGUGUGAGGAAA	401	1018-1038	UTUCCUCACACGACCAUACAAGC	443	1016-1038
AD-254113.1	UGAAGAUGCUGCAGCGGAUUAU	70	827-847	ATAUCCGCUGCAGCAUCUUCACC	444	825-847
AD-254452.1	CUGCAGGGCUTUGAUGGCAUU	402	1258-1278	AAUGCCAUCAAAGCCCUGCAGGC	140	1256-1278
AD-254222.1	UGGCUACGGAGACGUGGUGUU	72	936-956	AACACCACGUCTCCGUAGCCAAA	445	934-956
AD-254114.1	GAAGAUGCTGCAGCGGAUAGA	403	828-848	UCUATCCGCUGCAGCAUCUUCAC	446	826-848
AD-254364.1	AGCUGGAGACACCUUCAUGU	74	1152-1172	ACAUTGAAGGUGUCUCCAGCUCC	447	1150-1172
AD-254218.1	UGUUUGGCTACGGAGACGUGU	404	932-952	ACACGUCUCCGTAGCCAAACAGC	448	930-952
AD-253543.1	UGCAUUCUCGAGAU CGCUUAU	76	140-160	ATAAGCGAUCUCGAGAAUGCAAA	449	138-160
AD-253554.1	GAUCGCUUAGCCGCGCUUUA	77	151-171	UTAAAGCGCGGCUAAGCGAUCUC	450	149-171
AD-254820.1	GCCCACCAGCCUGUGAUUUGA	78	1853-1873	UCAAAUCACAGGCTGGUGGGCAG	451	1851-1873
AD-254231.1	AGACGUGGTGTUUGUCAGCAA	405	945-965	UTGCTGACAAACACCACGUCUCC	452	943-965
AD-254116.1	AGAUGCUGCAGCGGAUAGACU	80	830-850	AGUCTATCCGCTGCAGCAUCUUC	453	828-850
AD-253855.1	AGAAGCAGAUCCUGUGCGUGU	81	530-550	ACACGCACAGGAUCUGCUUCUCU	150	528-550
AD-254266.1	GCUUGUAUGGTCGUGUGAGGA	406	1016-1036	UCCUCACACGACCAUACAAGCCC	151	1014-1036
AD-253547.1	UUCUCGAGAU CGCUUAGCCGU	83	144-164	ACGGCUAAGCGAUCUCGAGAAUG	152	142-164
AD-254048.1	UGAGAAGGTUGAUCUGACCCA	407	762-782	UGGGTCAGAUCAACCUUCUCAA	454	760-782
AD-253542.1	UUGCAUUCTCGAGAU CGCUUA	408	139-159	UAAGCGAUCUCGAGAAUGCAAAG	154	137-159
AD-254745.1	UGCGUUGUGCAGACUCUAUUU	86	1750-1770	AAAUAGAGUCUGCACAACGCAGG	155	1748-1770
AD-253959.1	UCCAACUCCUGCACCGUUCUU	87	652-672	AAGAACGGUGCAGGAGUUGGACG	156	650-672
AD-253552.1	GAGAUCCCTUAGCCGCGCUUU	409	149-169	AAAGCGCGGCUAAGCGAUCUCGA	157	147-169
AD-254217.1	CUGUUUGGCUACGGAGACGUU	89	931-951	AACGTCTCCGUAGCCAAACAGCU	455	929-951
AD-254363.1	GAGCUGGAGACACCUUCAAUU	90	1151-1171	AAUUGAAGGUGTCTCCAGCUCCC	456	1149-1171
AD-253622.1	GGCUGAGAAGTGGGAGGCGUU	410	219-239	AACGCCTCCCACUTCUCAGCCUU	457	217-239
AD-254230.1	GAGACGUGGUGUUUGUCAGCA	92	944-964	UGCUGACAAACACCACGUCUCCG	161	942-964
AD-253853.1	AGAGAAGCAGAUCCUGUGCGU	93	528-548	ACGCACAGGAUCUGCUUCUCUUC	162	526-548
AD-253534.1	UUUUCUCUTUGCAUUCUCGAU	411	131-151	ATCGAGAAUGCAAAGAGAAAAUG	458	129-151

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Положение в XM_017004061.1
AD-254870.1	GGAGCCCACCTUGGAAUUAU	412	1941-1961	ATUAAUTCCAAGGTGGGCUCCAA	459	1939-1961
AD-253541.1	UUUGCAUUCUCGAGAUCGCUU	96	138-158	AAGCGATCUCGAGAAUGCAAAGA	165	136-158
AD-254337.1	CUCCACUCGGAUGCUUCCCU	97	1105-1125	AGGGAAAGCAUCCGAGUGGAGCA	166	1103-1125
AD-254265.1	GGCUUGUATGGUCGUGUGAGU	413	1015-1035	ACUCACACGACCATAACAAGCCCC	460	1013-1035
AD-254223.1	GGCUACGGAGACGUGGUGUUU	99	937-957	AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA	168	935-957
AD-254047.1	UUGAGAAGGUTGAUCUGACCU	414	761-781	AGGUCAGAUCAACCUUCUCAAAG	169	759-781
AD-254871.1	GAGCCCACCUTGGAUUAAGU	415	1942-1962	ACUUAATUCCAAGGUGGGCUCCA	170	1940-1962
AD-254280.1	CUUGUCUGTGCCUGGGCUGAU	416	1048-1068	ATCAGCCCAGGCACAGACAAGCA	461	1046-1068
AD-253539.1	UCUUUGCATUCUCGAGAUCGU	417	136-156	ACGATCTCGAGAATGCAAAGAGA	462	134-156
AD-254403.1	GCAGGAAGCACUGAGAUUCGU	104	1209-1229	ACGAAUCUCAGTGCUUCCUGCAC	463	1207-1229
AD-253549.1	CUCGAGAUCGCUUAGCCGCGU	105	146-166	ACGCGGCUAAGCGAUCUCGAGAA	174	144-166
AD-254368.1	GGAGACACCUTCAAUGCCUCU	418	1156-1176	AGAGGCAUUGAAGGUGUCUCCAG	175	1154-1176
AD-253540.1	CUUUGCAUTCTCGAGAUCGCU	419	137-157	AGCGAUCUCGAGAAUGCAAAGAG	176	135-157
AD-254076.1	UGGAUCCACATUGAGGGCCGU	420	790-810	ACGGCCCUC AATGTGGAUCCACU	464	788-810
AD-254022.1	CUGCCAGATGTGUCUGCUACA	421	736-756	UGUAGCAGACACATCUGGCAGGC	465	734-756

Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей дцРНК средств к кетогексокиназе

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-253536.1	ususcucuundGcdAuucucgagau L96	466	asdTsucdCgdAgaudGcdAaagag aasasa	536	UUUUCUCUUUGCAUUCUCGAGAU	317
AD-254743.1	cscsugcguudGudGcagacucua L96	467	asdTsagdAgdTcugcdAcdAacgca ggsgsc	537	GCCCUGCGUUGUGCAGACUCUAU	318
AD-253553.1	asgsaucgcudTadGccgcgcuuua L96	468	usdAsaadGcdGcggcdTadAgcgau cuscsg	538	CGAGAU CGCUUAGCCGCGCUUUA	319
AD-253535.1	ususcucuundTgdCauucucgaga L96	469	usdCsucdGadGaaugdCadAagaga aasasu	539	AUUUUCUCUUUGCAUUCUCGAGA	320
AD-253592.1	gsusgaguccdAudCugacaagcga L96	470	usdCsgcdTudGucagdAudGgacuc acsasg	540	CUGUGAGUCCAUCUGACAAGCGA	321
AD-253960.1	cscsaacuccdTgdCaccguucucu L96	471	asdGsagdAadCggugdCadGgaguu ggsasc	541	GUCCAACUCCUGCACCJUUCUCU	322
AD-254267.1	csusuguaugdGudCgugugaggaa L96	472	usdTscddTcdAcacgdAcdCauaca agscsc	542	GGCUUGUAUGGUCGUGAGAGAA	323
AD-254078.1	gsasuccacadTudGagggccggaa L96	473	usdTscddGgdCccucdAadTgugga ucscsa	543	UGGAUCCACAUUGAGGGCCGGAA	324
AD-254216.1	gscsuguuugdGcdTacggagacgu L96	474	asdCsgudCudCcgua dGcdCaaaca gcsusg	544	CAGCUGUUUGGCUACGGAGACGU	325
AD-255050.1	csusgccauudTadAuuagcugcau L96	475	asdTsgcdAgdCuaaudTadAauggc agsas	545	AUCUGCCAUUUAAUUAGCUGCAU	326
AD-253854.1	gsasgaagcadGadTccugugcguu L96	476	asdAscgdCadCaggadTcdTgcuuc ucsusu	546	AAGAGAAGCAGAUCCUGUGCGUG	327
AD-253593.1	usgsaguccadTcdTgacaagcgau L96	477	asdTscgdCudTgucadGadTggacu cscsa	547	UGUGAGUCCAUCUGACAAGCGAG	328
AD-253545.1	csasuucucgdAgdAucgcuuagcu L96	478	asdGscudAadGcgau dCudCgagaa ugscsa	548	UGCAUUCUCGAGAU CGCUUAGCC	329
AD-253594.1	gsasguccaudCudGacaagcgagu L96	479	asdCsucdGcdTugucdAgdAuggac ucsasc	549	GUGAGUCCAUCUGACAAGCGAGG	330
AD-254115.1	asasgaugcudGcdAgcggauagau L96	480	asdTsucdAudCcgcdGcdAgcauc uuscscsa	550	UGAAGAUGCUGCAGCGGAUAGAC	331

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-253546.1	asusucucgadGadTcgcuuagccu L96	481	asdGsgcdTadAgcgadTcdTcgaga ausgsc	551	GCAUUCUCGAGAUCCGUAGCCG	332
AD-253623.1	gscsugagaadGudGggaggcguuu L96	482	asdAsacdGcdCucccdAcdTucuca gcscsu	552	AGGCUGAGAAGUGGGAGGCGUUG	333
AD-254118.1	asusgcugcadGcdGgauagacgca L96	483	usdGscgdTcdTaucddGcdTgcagc auscsu	553	AGAUGCUGCAGCGGAUAGACGCA	334
AD-253537.1	uscsucuugdCadTucucgagauu L96	484	asdAsucdTcdGagaadTgdCaaaga gasasa	554	UUUCUCUUUGCAUUCUCGAGAUUC	335
AD-253538.1	csuscuuugcdAudTcucgagauu L96	485	asdGsaudCudCgagadAudGcaaag agsasa	555	UUCUCUUUGCAUUCUCGAGAUUCG	336
AD-254869.1	usgsgagcccdAcuCuggaauuaa L96	486	usdTsaadTudCcaagdGudGggcuc casasg	556	CUUGGAGCCCACCUUGGAAUUA	337
AD-254065.1	cscscaguucdAadGuggauccaca L96	487	usdGsugdGadTccacdTudGaacug ggsusc	557	GACCCAGUUCAAGUGGAUCCACA	606
AD-253883.1	cscsugguggdAcdaaguaccuuaa L96	488	usdTsaagdGgdTacuudGudCcacca ggscsu	558	AGCCUGGUGGACAAGUACCCUAA	338
AD-253548.1	uscsucgagadTcdGcuuagccgcu L96	489	asdGscgdGcdTaagcdGadTcucga gasasu	559	AUUCUCGAGAUCCGUAGCCGCG	339
AD-253595.1	asgsuccaucdTgdAcaagcgagga L96	490	usdCscudCgdCuugudCadGaugga cuscsa	560	UGAGUCCAUCUGACAAGCGAGGA	340
AD-254215.1	asgscuguuudGgdCuacggagacu L96	491	asdGsucdTcdCguagdCcdAaacag cusgsg	561	CCAGCUGUUUGGCUACGGAGACG	341
AD-254117.1	gsasugcugcdAgdCggauagacgu L96	492	asdCsgudCudAuccgdCudGcagca ucsusu	562	AAGAUGCUGCAGCGGAUAGACGC	342
AD-255047.1	asasucugccdAudTuaauuagcuu L96	493	asdAsgcdTadAuaaadAudGgcaga uususu	563	AAAAUCUGCCAUUUAAUAGCUG	343
AD-253544.1	gscsauucudGadGaucgcuuagu L96	494	asdCsuaadAgdCgaucdTcdGagaau gcsasa	564	UUGCAUUCUCGAGAUCCGUAGC	344
AD-254268.1	ususguauggdTcdGugugaggaaa L96	495	usdTsuudCudCacacdGadCcauac aasgsc	565	GCUUGUAUGGUCGUGUGAGGAAA	345
AD-254113.1	usgsaagaugdCudGcagcggaauu L96	496	asdTsaudCcdGcugcdAgdCaucuu cascsc	566	GGUGAAGAUGCUGCAGCGGAUAG	346

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-254452.1	csusgcagggdCudTugauggcauu L96	497	asdAsugdCcdAucaadAgdCccugc agsgsc	567	GCCUGCAGGGCUUUGAUGGCAUC	347
AD-254222.1	usgsgcuacgdGadGacgugguguu L96	498	asdAscadCcdAcgucdTcdCguagc casasa	568	UUUGGCUACGGAGACGUGGUGUU	348
AD-254114.1	gsasagaugcdTgdCagcggauaga L96	499	usdCsuadTcdCgcugdCadGcaucu ucsasc	569	GUGAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	349
AD-254364.1	asgscuggagdAcdAccuuccaangu L96	500	asdCsaudTgdAaggudGudCuccag cuscsc	570	GGAGCUGGAGACACCUUCAUAGC	350
AD-254218.1	usgsuuuggcdTadCggagacgugu L96	501	asdCsacdGudCuccgdTadGccaaa casgsc	571	GCUGUUUGGCUACGGAGACGUGG	351
AD-253543.1	usgscauucudCgdAgaucgcuuau L96	502	asdTsaaadGcdGaucudCgdAgaang casasa	572	UUUGCAUUCUCGAGAUCGCUUAG	352
AD-253554.1	gsasucgcuudAgdCgcgcguuuuaa L96	503	usdTsaadAgdCgcggdCudAagcga ucsusc	573	GAGAUCGCUUAGCCGCGCUUUAA	353
AD-254820.1	gscscaccadGcdCugugauuuga L96	504	usdCsaadAudCacagdGcdTggugg gcsasg	574	CUGCCCACCAGCCUGUGAUUUGA	354
AD-254231.1	asgsacguggdTgdTuugucagcaa L96	505	usdTsgcdTgdAcaaadCadCcacgu cuscsc	575	GGAGACGUGGUGUUUGUCAGCAA	355
AD-254116.1	asgsaugcugdCadGcggauagacu L96	506	asdGsucdTadTccgcdTgdCagcau cususc	576	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGACG	356
AD-253855.1	asgsaagcagdAudCcugugcgugu L96	507	asdCsacdGcdAcaggdAudCugcuu cuscsc	577	AGAGAAGCAGAUCCUGUGCGUGG	357
AD-254266.1	gscsuuguaudGgdTcgugugagga L96	508	usdCscudCadCacgadCcdAuacaa gcscsc	578	GGGCUUGUAUGGUCGUGUGAGGA	358
AD-253547.1	ususcucgagdAudCgcuuagccgu L96	509	asdCsggdCudAagcgdAudCucgag aasusg	579	CAUUCUCGAGAUCGCUUAGCCGC	359
AD-254048.1	usgsagaaggdTudGaucugacca L96	510	usdGsggdTcdAgaucdAadCcuucu casasa	580	UUUGAGAAGGUUGAUCUGACCCA	360
AD-253542.1	ususgcauucdTcdGagaucgcuua L96	511	usdAsagdCgdAucudGadGaaugc aasasg	581	CUUUGCAUUCUCGAGAUCGCUUA	361
AD-254745.1	usgscguugudGcdAgacucuaauu L96	512	asdAsaudAgdAgucudGcdAcaacg casgsg	582	CCUGCGUUGUGCAGACUCUAUUC	362

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-253959.1	uscscAACUCdCudGcaccGUUCUU L96	513	asdAsgadAc dGgugcdAgdGaguug gascsg	583	CGUCCAACUCCUGCACCGUUCUC	363
AD-253552.1	gsasgaucgcdTudAgccgcgcUUU L96	514	asdAsag dCgdCggcudAadGcgau cscgsa	584	UCGAGAUCGCUUAGCCGCGCUUU	364
AD-254217.1	csusguuuggdCudAcggagacguu L96	515	asdAscgdTcdTccgudAgdCcaa ac agscsu	585	AGCUGUUUGGCUACGGAGACGUG	365
AD-254363.1	gsasgcuggadGadCaccuucAAUU L96	516	asdAsuudGadAggugdTcdTccag c ucscsc	586	GGGAGCUGGAGACACCUUCAUG	366
AD-253622.1	gsgscugagadAgdTgggaggcguu L96	517	asdAscgdCcdTcccadCudTcucag ccusu	587	AAGGCUGAGAAGUGGGAGGCGUU	367
AD-254230.1	gsasgacgugdGudGuuugucagca L96	518	usdGscudGadCaaacdAc dCacguc ucscsg	588	CGGAGACGUGGUGUUUGUCAGCA	368
AD-253853.1	asgsagaagcdAgdAuccugugcgu L96	519	asdCsgcdAc dAggaudCudGcuuc cusc	589	GAAGAGAAGCAGAUCUGUGCGU	369
AD-253534.1	ususuuucucudTudGcauucucgau L96	520	asdTscgdAgdAaugcdAadAgagaa aasusg	590	CAUUUUCUCUUUGCAUUCUCGAG	370
AD-254870.1	gsgsagcccadCcdTuggaauuaau L96	521	asdTsua dAudTccaadGgdTgggcu ccasa	591	UUGGAGCCCACCUUGGAAUUAAG	371
AD-253541.1	ususugcauudCudCgagaucgcuu L96	522	asdAsgcdGadTcucgdAgdAaugca aasgsa	592	UCUUUGCAUUCUCGAGAUCGCUU	372
AD-254337.1	csusccacucdGgdAugcuuucccu L96	523	asdGsggdAadAgcaudCcdGagugg agscsa	593	UGCUCACUCGGAUGCUUCCCCG	373
AD-254265.1	gsgscuugudTgdGucgugugagu L96	524	asdCsudAc dAcgacdCadTacaag ccscsc	594	GGGGCUUGUAUGGUCGUGUGAGG	374
AD-254223.1	gsgscuacggdAgdAcgugguguuu L96	525	asdAsacdAc dCacgudCudCcgua g ccasa	595	UUGGCUACGGAGACGUGGUGUUU	375
AD-254047.1	ususgagaagdCudTgaucugaccu L96	526	asdGsgudCadGaucadAc dCuucuc aasasg	596	CUUUGAGAAGGUUGAUCUGACCC	376
AD-254871.1	gsasgcccacdCudTggaauuaagu L96	527	asdCsua dAadTuccadAgdGugggc ucscsa	597	UGGAGCCCACCUUGGAAUUAAGG	377
AD-254280.1	csusugucugdTgdCcugggcugau L96	528	asdTscadGcdCcaggdCadCagaca agscsa	598	UGCUGUCUGUGCCUGGGCUGAG	378

Название дуплекса	Смысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:	Последовательность-мишень в мРНК 5'→3'	SEQ ID NO:
AD-253539.1	uscsuuugcadTudCucgagaucgu L96	529	asdCsgadTcdTcgagdAadTgcaaa gasgsa	599	UCUCUUUGCAUUCUCGAGAUCGC	379
AD-254403.1	gscsaggaagdCadCugagauucgu L96	530	asdCsgadAudCucagdTgdCuuccu gcsasc	600	GUGCAGGAAGCACUGAGAUUCGG	380
AD-253549.1	csuscgagaudCgdCuuagccgcgu L96	531	asdCsgcdGgdCuaagdCgdAucucg agsasa	601	UUCUCGAGAUCGCUUAGCCGCGC	381
AD-254368.1	gsgsagacacdCudTcaaugccucu L96	532	asdGsagdGcdAuugadAgdGugucu ccsasg	602	CUGGAGACACCUUCA AUGCCUCC	382
AD-253540.1	csusuugcaudTcdTcgagaucgu L96	533	asdGscgdAudCucgadGadAugcaa agsasg	603	CUCUUUGCAUUCUCGAGAUCGCU	383
AD-254076.1	usgsgauccadCadTugagggccgu L96	534	asdCsggdCcdCucaadTgdTggauc cascsu	604	AGUGGAUCCACAUUGAGGGCCGG	384
AD-254022.1	csusgccagadTgdTgucugcuaca L96	535	usdGsuadGcdAgacadCadTcuggc agsgsc	605	GCCUGCCAGAUUGUGUCUGCUACA	385

Таблица 6. Скрининг *in vitro* КГК 10 нМ в клетках Нер3В

Дуплекс	Средн. % остаточной мРНК КГК	SD
AD-251799.1	39,4	4,3
AD-253006.1	65,4	4,5
AD-251816.1	79,6	20,6
AD-251798.1	75,9	8,7
AD-251855.1	62,2	4,6
AD-252223.1	70,1	11,8
AD-252530.1	73,4	23,8
AD-252341.1	67,9	11,5
AD-252484.1	94,0	7,9
AD-253313.1	68,1	6,5
AD-252117.1	31,8	5,0
AD-251856.1	33,9	4,6
AD-251808.1	46,9	2,1
AD-251857.1	66,2	30,9
AD-252378.1	66,9	10,9
AD-251809.1	37,2	6,6
AD-251886.1	71,7	11,2
AD-252381.1	40,8	4,3
AD-251800.1	41,9	3,2
AD-251801.1	69,9	7,2
AD-253132.1	86,4	9,3
AD-252146.1	19,0	2,5
AD-251811.1	46,7	5,7
AD-251858.1	99,4	8,9
AD-252483.1	29,0	3,2
AD-252380.1	90,4	21,8
AD-253310.1	85,1	19,2
AD-251807.1	72,4	6,6
AD-252531.1	13,1	0,8
AD-252376.1	51,1	6,4
AD-252715.1	56,5	6,9
AD-252490.1	76,9	10,1
AD-252377.1	76,2	8,2
AD-252628.1	75,8	2,5
AD-252486.1	71,8	4,2
AD-251806.1	31,7	6,8
AD-251817.1	29,2	2,7
AD-253083.1	61,1	8,0

AD-252498.1	7,3	2,0
AD-252379.1	24,0	4,1
AD-252118.1	51,0	23,3
AD-252529.1	78,9	11,8
AD-251810.1	94,3	3,7
AD-252314.1	42,5	9,8
AD-251805.1	49,6	3,2
AD-253008.1	54,2	2,5
AD-252222.1	47,4	9,7
AD-251815.1	60,1	4,0
AD-252485.1	52,6	51,1
AD-252627.1	18,8	0,9
AD-251885.1	49,6	5,1
AD-252497.1	70,3	12,6
AD-252116.1	49,0	19,2
AD-251797.1	57,7	7,2
AD-253133.1	58,5	8,2
AD-251804.1	42,3	7,4
AD-252600.1	59,5	18,8
AD-252528.1	26,5	1,5
AD-252450.1	51,0	9,6
AD-252313.1	38,7	2,2
AD-253134.1	85,0	10,9
AD-252543.1	69,3	5,8
AD-251802.1	19,4	2,9
AD-252666.1	20,5	4,7
AD-251812.1	23,4	2,8
AD-252632.1	58,0	7,6
AD-251803.1	50,3	10,6
AD-252339.1	12,5	1,2
AD-252285.1	12,9	0,8

Таблица 7. Скрининг *in vitro* КГК 10 нМ в клетках Нер3В

Дуплекс	Средн. % остаточной мРНК КГК	SD
AD-253536.1	52,7	13,0
AD-254743.1	77,8	8,8
AD-253553.1	76,6	5,6
AD-253535.1	113,4	10,1
AD-253592.1	125,7	25,1
AD-253960.1	116,5	13,6
AD-254267.1	64,2	6,3
AD-254078.1	90,6	3,4

AD-254216.1	105,3	9,9
AD-255050.1	92,0	4,4
AD-253854.1	42,8	7,6
AD-253593.1	75,3	7,4
AD-253545.1	78,6	5,3
AD-253594.1	99,4	8,9
AD-254115.1	97,2	5,4
AD-253546.1	77,4	8,0
AD-253623.1	93,9	3,9
AD-254118.1	96,2	7,1
AD-253537.1	47,9	9,7
AD-253538.1	62,6	7,2
AD-254869.1	94,1	4,1
AD-254065.1	41,4	2,0
AD-253883.1	73,7	9,2
AD-253548.1	104,7	5,5
AD-253595.1	111,9	11,2
AD-254215.1	98,9	12,5
AD-254117.1	112,6	7,9
AD-255047.1	80,6	4,9
AD-253544.1	58,0	5,1
AD-254268.1	42,1	2,2
AD-254113.1	70,3	4,0
AD-254452.1	54,4	7,7
AD-254222.1	42,2	2,4
AD-254114.1	88,9	7,1
AD-254364.1	46,5	3,4
AD-254218.1	81,8	3,8
AD-253543.1	50,0	4,0
AD-253554.1	75,2	5,9
AD-254820.1	77,0	4,6
AD-254231.1	48,9	6,7
AD-254116.1	66,8	3,2
AD-253855.1	67,4	12,2
AD-254266.1	36,7	3,6
AD-253547.1	79,9	3,5
AD-254048.1	70,3	7,1
AD-253542.1	32,5	4,2
AD-254745.1	71,9	1,9
AD-253959.1	78,5	11,8
AD-253552.1	82,6	5,5

AD-254217.1	70,7	9,9
AD-254363.1	47,0	5,8
AD-253622.1	77,8	2,6
AD-254230.1	67,3	2,7
AD-253853.1	87,9	7,4
AD-253534.1	78,9	5,8
AD-254870.1	74,5	3,9
AD-253541.1	119,8	78,6
AD-254337.1	74,2	5,5
AD-254265.1	15,7	2,2
AD-254223.1	29,3	2,2
AD-254047.1	63,6	6,0
AD-254871.1	83,1	5,3
AD-254280.1	85,7	16,3
AD-253539.1	35,0	2,9
AD-254403.1	18,1	1,3
AD-253549.1	54,2	5,5
AD-254368.1	91,7	5,8
AD-253540.1	51,0	8,5
AD-254076.1	80,8	8,8
AD-254022.1	36,2	2,2

Пример 3. Скрининг *in vivo* дцРНК дуплексов на мышах

Представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в ходе представленных выше исследований *in vitro*, оценивали *in vivo*.

В частности, мышам дикого типа (C57BL/6) возрастом 6-8 недель вводили 100 мл 2×10^{11} вирусных частиц/мл раствора вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего кетогексокиназу человека (AAV КГКч), путем внутривенной инъекции в хвостовую вену в День -14.

В день 0 мышам подкожно вводили однократную дозу 10 мг/кг представляющего интерес дуплекса или контрольного PBS (n=3/группа). В Таблице 8 представлены группы лечения и дуплексы, которые вводили мышам.

В день 10 после введения дозы животных умерщвляли, собирали образцы печени и мгновенно замораживали в жидком азоте. Выделяли тканевую мРНК и измеряли экспрессию КГК человека с помощью ОТ-кПЦР, как описано выше. Уровни мРНК КГК человека сравнивали с уровнем мРНК гена домашнего хозяйства GAPDH. Затем значения нормализовали по среднему значению для контрольной группы на растворителе PBS. Данные выражены в процентах от исходного значения и представлены как среднее значение плюс стандартное отклонение. Как показано в Таблице 9 и на Фигуре 2, уровни мРНК КГК человека снижались при обработке однократной дозой мРНК, направленной на КГКч, в количестве 10 мг/кг.

Таблица 8. Дуплексы дцРНК для того, чтобы *in vivo* показать

ID дуплекса	Диапазон в ХМ_017004061.1
PBS	N/A
AD-252498.1	943-965
AD-252339.1	788-810
AD-252285.1	734-756
AD-252531.1	1016-1038
AD-254265.1	1013-1035
AD-254403.1	1207-1229
AD-252627.1	1149-1171
AD-252146.1	574-596
AD-252666.1	1207-1229
AD-252379.1	828-850
Без AAV контроля	N/A

Таблица 9. Скрининг миРНК КГК *in vivo*

Обработка	Среднее кратное изменение	SEM	% нокдауна
PBS	1,02	0,24	0,00
AD-252498.1	0,50	0,21	51,27
AD-252339.1	0,90	0,25	12,10
AD-252285.1	0,55	0,09	46,33
AD-252531.1	0,88	0,27	14,06
AD-254265.1	1,21	0,32	-18,52
AD-254403.1	0,88	0,19	13,63
AD-252627.1	1,04	0,11	-2,34
AD-252146.1	0,63	0,05	37,77
AD-252666.1	0,80	0,12	22,07
AD-252379.1	1,11	0,03	-8,53
Без AAV контроля	0,00	0,00	0,00

ЭКВИВАЛЕНТЫ

Специалистам в данной области известны, или они сумеют установить с помощью не более чем стандартных экспериментов, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КГК) в клетке, где указанная дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь включает область комплементарности к мРНК, кодирующей КГК, и где область комплементарности включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5.

2. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КГК) в клетке, где указанная дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 943-965; 788-810; 734-756; 1016-1038; 1013-1035; 1207-1229; 1149-1171; 574-596; 1207-1229 или 828-850 из SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

3. ДцРНК средство по п.1 или п.2, где антисмысловая цепь включает по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не больше чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-252498.1, AD-252339.1, AD-252285.1, AD-252531.1, AD-254265.1, AD-254403.1, AD-252627.1, AD-252146.1, AD-252666.1 и AD-252379.1.

4. ДцРНК средство по любому из пп. 1-3, где дцРНК средство включает по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

5. ДцРНК средство по любому из пп. 1-4, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию.

6. ДцРНК средство по любому из пп. 1-5, где все нуклеотиды смысловой цепи включают модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи включают модификацию.

7. ДцРНК средство по любому из пп. 4-6, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, разомкнутого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, затрудненного этил-нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-

модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, включающего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, включающего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, включающего метилфосфонатную группу, нуклеотида, включающего 5'-фосфат, нуклеотида, включающего миметик 5'-фосфата, термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

8. ДцРНК средство по любому из пп. 4-6, где модификации на нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из ЛНК, HNA, GNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила и гликоля; и их комбинаций.

9. ДцРНК по любому из пп. 4-6, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и винил-фосфонат нуклеотид; и их комбинаций.

10. ДцРНК по любому из пп.4-6, где по меньшей мере одна из модификаций на нуклеотидах является термически дестабилизирующей модификацией нуклеотида.

11. ДцРНК по п.10, где термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из абазической модификации; некомплементарности с противостоящим нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, разомкнутых нуклеиновых кислот (UNA) и глицерин-нуклеиновой кислоты (GNA).

12. ДцРНК средство по любому из пп.1-11, где двухцепочечная область имеет длину 19-30 пар нуклеотидов.

13. ДцРНК средство по п.12, где двухцепочечная область имеет длину 19-25 пар нуклеотидов.

14. ДцРНК средство по п.12, где двухцепочечная область имеет длину 19-23 пары нуклеотидов.

15. ДцРНК средство по п.12, где двухцепочечная область имеет длину 23-27 пар нуклеотидов.

16. ДцРНК средство по п.12, где двухцепочечная область имеет длину 21-23 пары нуклеотидов.

17. ДцРНК средство по любому из пп.1-16, где каждая цепь независимо имеет длину не больше 30 нуклеотидов.

18. ДцРНК средство по любому из пп.1-17, где смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида.

19. ДцРНК средство по любому из пп.1-18, где область комплементарности является

по меньшей мере 17 нуклеотидами длину.

20. дцРНК средство по любому из пп.1-19, где область комплементарности имеет длину от 19 до 23 нуклеотидов.

21. дцРНК средство по любому из пп.1-18, где область комплементарности имеет длину 19 нуклеотидов.

22. ДцРНК средство по любому из пп.1-21, где по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 1 нуклеотида.

23. ДцРНК средство по любому из пп.1-21, где по меньшей мере одна цепь включает 3'-оверхенг по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

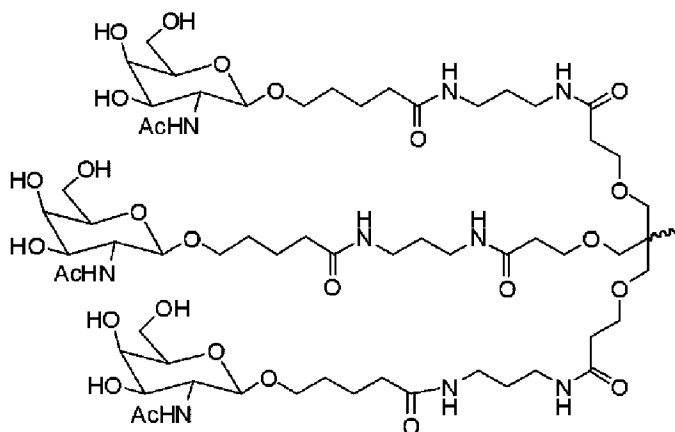
24. ДцРНК средство по любому из пп.1-23, дополнительно включающее лиганд.

25. ДцРНК средство по п.24, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи дцРНК средства.

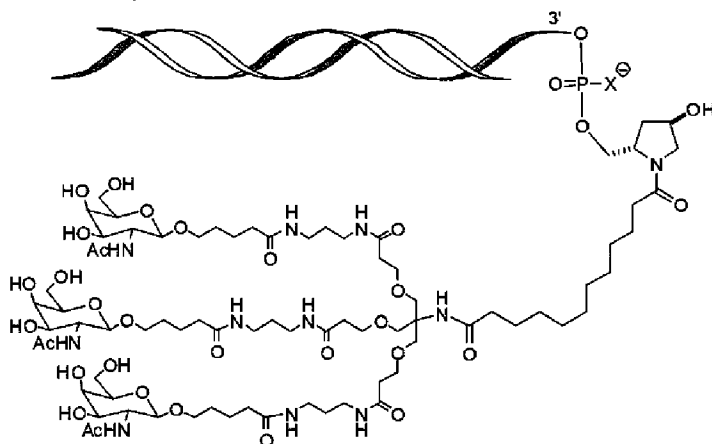
26. дцРНК средство по п.24 или 25, где лиганд является производным N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

27. ДцРНК средство по любому из пп.24-26, где лиганд является одним или больше производными GalNAc, присоединенными через моновалентный, бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

28. ДцРНК средство по п.26 или 27, где лиганд представляет собой:



29. ДцРНК средство по п.28, где дцРНК средство конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

30. ДцРНК средство по п.29, где X представляет собой O.

31. ДцРНК средство по любому из пп.1-30, где дцРНК средство дополнительно включает по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

32. ДцРНК средство по п.31, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

33. ДцРНК средство по п.32, где цепь является антисмысловой цепью.

34. ДцРНК средство по п.32, где цепь является смысловой цепью.

35. ДцРНК средство по п.31, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

36. ДцРНК средство по п.35, где цепь является антисмысловой цепью.

37. ДцРНК средство по п.35, где цепь является смысловой цепью.

38. ДцРНК средство по п.31, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'- и на 3'-конце одной цепи.

39. ДцРНК средство по п.38, где цепь является антисмысловой цепью.

40. ДцРНК средство по любому из пп.1-39, где пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса является парой оснований AU.

41. Клетка, содержащая дцРНК средство по любому из пп.1-40.

42. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего кетогексокиназу (КГК), включающая дцРНК средство по любому из пп.1-40.

43. Фармацевтическая композиция по п.42, где дцРНК средство находится в безбуферном растворе.

44. Фармацевтическая композиция по п.43, где безбуферным раствором является солевой раствор или вода.

45. Фармацевтическая композиция по п.42, где указанное дцРНК средство находится в буферном растворе.

46. Фармацевтическая композиция по п.45, где буферный раствор включает ацетат, цитрат, протамин, карбонат или фосфат, или их любую комбинацию.

47. Фармацевтическая композиция по п.46, где буферным раствором является фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

48. Способ ингибирования экспрессии гена кетогексокиназы (КГК) в клетке, включающий контакт клетки с дцРНК средством по любому из пп.1-40 или фармацевтической композицией по любому из пп.42-47, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии гена КГК в клетке.

49. Способ по п.48, где клетка присутствует в организме субъекта.

50. Способ по п.49, где субъектом является человек.

51. Способ по п.50, где субъект имеет нарушение, ассоциированное с кетогексокиназой (КГК).

52. Способ по любому из пп.48-51, где контакт клетки с дцРНК средством

ингибирует экспрессию кетогексокиназы по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

53. Способ по любому из пп.48-52, где ингибирование экспрессии кетогексокиназы снижает уровень белка кетогексокиназы в сыворотке крови субъекта по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

54. Способ лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК средства по любому из пп.1-40 или фармацевтической композиции по любому из пп.42-47, с осуществлением, таким образом, лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы.

55. Способ предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества дцРНК средства по любому из пп.1-40 или фармацевтической композиции по любому из пп.42-47, с осуществлением, таким образом, предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, при котором может быть эффективным снижение экспрессии кетогексокиназы.

56. Способ по п.54 или 55, где нарушением является нарушение, ассоциированное с кетогексокиназой.

57. Способ по п.56, где КГК-ассоциированное нарушение включает заболевание печени.

58. Способ по п.57, где заболеванием печени является неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) или неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).

59. Способ по п.56, где КГК-ассоциированное заболевание включает дислипидемию или патологическое отложение липидов или дисфункцию.

60. Способ по п.59, где дислипидемия включает одно или более из гиперлипидемии, повышенного холестерина ЛПНП, пониженного холестерина ЛПВП, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения и метаболического синдрома.

61. Способ по п.56, где КГК-ассоциированное заболевание включает нарушение гликемического контроля.

62. Способ по п.61, где нарушение гликемического контроля включает одно или более из инсулинорезистентности, не связанной с иммунным ответом на инсулин, диабет 2-го типа и нарушение толерантности к глюкозе.

63. Способ по п.56, где КГК-ассоциированное заболевание включает заболевание почек.

64. Способ по п.63, где заболевание почек включает по меньшей мере одно из острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев и хронической болезни почек.

65. Способ по п.56, где КГК-ассоциированное заболевание включает сердечно-сосудистое заболевание.

66. Способ по п.65, где сердечно-сосудистое заболевание включает по меньшей мере одно из дисфункции эндотелиальных клеток и артериальной гипертензии.

67. Способ по любому из пп.54-66, где субъектом является человек.

68. Способ по п.67, где субъект имеет или подвержен риску нарушения функции почек.

69. Способ по любому из пп.54-68, где дцРНК средство вводят субъекту в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

70. Способ по любому из пп.54-69, где дцРНК средство вводят субъекту подкожно.

71. Способ по любому из пп.54-70, дополнительно включающий введение средства для лечения КГК-ассоциированного заболевания.

72. Способ по любому из пп.54-71, дополнительно включающий определение уровня кетогексокиназы в образце(ах) субъекта.

73. Способ по п.72, где уровень кетогексокиназы в образце(ах) субъекта является уровнем белка кетогексокиназы в образце(ах) крови или сыворотки.

74. Способ по любому из пп.54-73, дополнительно включающий измерение уровня метаболизма фруктозы у субъекта.

75. Способ по любому из пп.54-74, дополнительно включающий измерение уровня мочевой кислоты у субъекта.

76. Способ по любому из пп.54-75, дополнительно включающий измерение уровня содержания липидов сыворотки у субъекта.

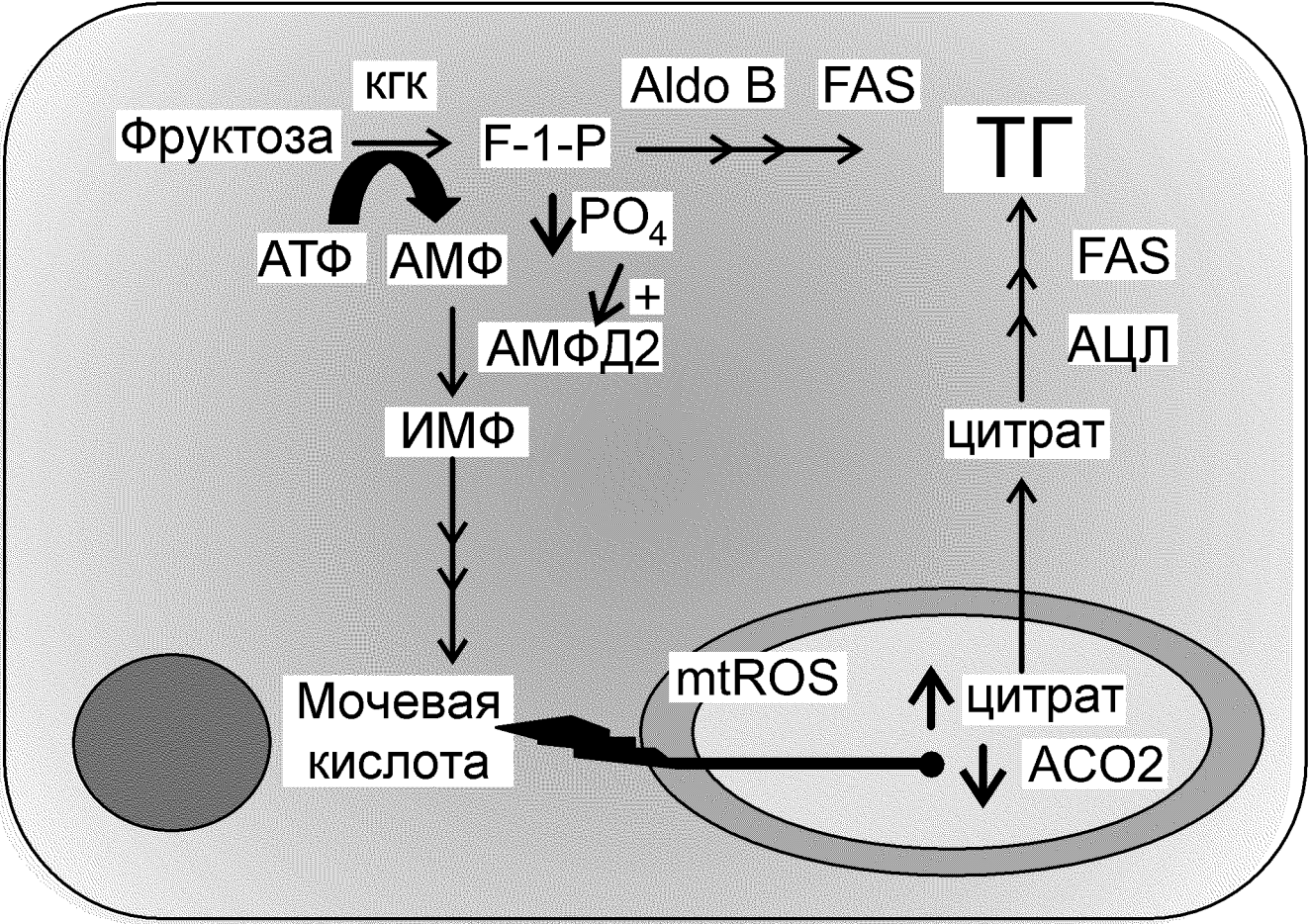
77. Набор, включающий дцРНК средство по любому из пп.1-40 или фармацевтическую композицию по любому из пп.42-47.

78. Флакон, включающий дцРНК средство по любому из пп.1-40 или фармацевтическую композицию по любому из пп.42-47.

79. Шприц, включающий дцРНК средство по любому из пп.1-40 или фармацевтическую композицию по любому из пп.42-47.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

