

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 043935

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.07.07

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

(21) Номер заявки  
201890394

(22) Дата подачи заявки  
2016.07.28

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA ДЛЯ ТРАНСТИРЕТИНА (TTR) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ АССОЦИИРОВАННЫХ С TTR ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 62/199,563; 62/287,518

(32) 2015.07.31; 2016.01.27

(33) US

(43) 2018.08.31

(86) PCT/US2016/044359

(87) WO 2017/023660 2017.02.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(56) WO-A1-2013075035

TERESA COELHO ET AL.: "Safety and Efficacy of RNAi Therapy for Transthyretin Amyloidosis", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 369, no. 9, 29 August 2013 (2013-08-29), pages 819-829, XP55163313, ISSN: 0028-4793, DOI:10.1056/NEJMoa1208760, the whole document

(72) Изобретатель:  
Циммерманн Трэйси, Чань Эми,  
Джадхав Васант, Майер Мартин,  
Раджив Каллантхоттатхил Г. (US)

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

(57) В изобретении предусмотрены средства на основе iRNA, например средства на основе двухнитевой iRNA, которые нацеливаются на ген транстиретина (TTR), и способы применения таких средств на основе iRNA для лечения или предупреждения ассоциированных с TTR заболеваний.

043935 B1

043935 B1

043935

B1

### Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/199563, поданной 31 июля 2015 г., и предварительной заявки на патент США № 62/287518, поданной 27 января 2016 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

Данная заявка связана с предварительной заявкой на патент США № 61/881257, поданной 23 сентября 2013 г., и международной заявкой № PCT/US 2014/056923, поданной 23 сентября 2014 г., полное содержание каждой из которых тем самым включено в данный документ посредством ссылки. Кроме того, данная заявка связана с предварительной заявкой на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., международной заявкой № PCT/US 2012/065601, поданной 16 ноября 2012 г., предварительной заявкой на патент США № 61/615618, поданной 26 марта 2012 г., предварительной заявкой на патент США № 61/680098, поданной 6 августа 2012 г., предварительной заявкой на патент США № 14/358972, поданной 16 мая 2014 г., и международной заявкой № PCT/US 2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которых тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII-копия, созданная 8 июля 2016 г., имеет название 121301-03020\_SL.txt, и ее размер составляет 68289 байт.

### Уровень техники

Транстиретин (TTR) (также известный как преальбумин) обнаруживается в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости (CSF). TTR переносит ретинолсвязывающий белок (RBP) и тироксин (T4), а также действует как переносчик ретинола (витамина А) благодаря его связи с RBP в крови и CSF. Транстиретин назван из-за его транспорта тироксина и ретинола. TTR также функционирует как протеаза и может расщеплять белки, в том числе apoA-I (основной аполипопротеин HDL),  $\beta$ -амилоидный пептид и нейропептид Y. См. Liz, M.A. et al. (2010) *IUBMB Life*, 62 (6):429-435.

TTR представляет собой тетрамер из четырех идентичных субъединиц размером 127 аминокислот (мономеров), которые характеризуются высоким содержанием бета-складчатой структуры. Каждый мономер имеет два бета-складчатых слоя из 4 нитей и форму вытянутого эллипсоида. Посредством взаимодействий антипараллельных бета-складчатых слоев мономеры связываются в димеры. Короткая петля из каждого мономера образует основное димер-димерное взаимодействие. Эти две пары петель разделяют противоположные выгнутые бета-складчатые слои димеров с образованием внутреннего канала.

Печень является основным местом экспрессии TTR. Другие важные места экспрессии включают сосудистое сплетение, сетчатку (в частности пигментный эпителий сетчатки) и поджелудочную железу.

Транстиретин является одним из по меньшей мере 27 различных типов белков, которые являются белками-предшественниками образования амилоидных фибрилл. См. Guan, J. et al. (Nov. 4, 2011) *Current perspectives on cardiac amyloidosis*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011.

Внеклеточное отложение амилоидных фибрилл в органах и тканях является отличительной чертой амилоидоза. Амилоидные фибриллы состоят из агрегатов неправильно свернутых белков, которые могут быть результатом либо избыточной выработки, либо специфических мутаций в белках-предшественниках. Амилоидогенный потенциал TTR может быть связан с его обширной бета-складчатой структурой; при этом рентгеноструктурные исследования показывают, что определенные амилоидогенные мутации дестабилизируют тетрамерную структуру белка. См., например, Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11.

Амилоидоз является общим термином для группы амилоидных заболеваний, которые характеризуются отложениями амилоида. Амилоидные заболевания классифицируются на основании их белка-предшественника; например, название начинается с "А" от амилоида, после чего идет сокращение белка-предшественника, например, ATTR для амилоидогенного транстиретина. Ibid.

Существует множество заболеваний, связанных с TTR, большинство из которых являются амилоидными заболеваниями. TTR с нормальной последовательностью ассоциирован с амилоидозом сердца у людей пожилого возраста и называется старческим системным амилоидозом (SSA) (также называемым старческим амилоидозом сердца (SCA) или амилоидозом сердца). SSA часто сопровождается микроскопическими отложениями во многих других органах. TTR-амилоидоз проявляется в различных формах. В случае более выраженного поражения периферической нервной системы, заболевание называют семейной амилоидотической полинейропатией (FAP). В случае, когда, главным образом, вовлечено сердце, а не нервная система, заболевание называют семейной амилоидотической кардиомиопатией (FAC). Третьим основным типом TTR-амилоидоза является лептоменингеальный амилоидоз, известный также как лептоменингеальный или менингоцереброваскулярный амилоидоз, амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС) или амилоидоз VII формы. Мутации в TTR также могут вызывать амилоидотическое помутнение стекловидного тела, синдром запястного канала и эутиреоидную гипертироксинемию, которая не является амилоидотическим заболеванием, которая, как считается, обусловлена повышенным связыванием тироксина с TTR из-за того, что мутантная молекула TTR имеет повышенную аффинность к тироксину. См., например, Moses et al. (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033.

Аномальные амилоидогенные белки могут быть либо наследственными, либо приобретенными в результате соматических мутаций. Guan, J. et al. (Nov. 4, 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011. Связанный с транстиретином ATTR является наиболее частой формой наследственного системного амилоидоза. Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442. Мутации TTR ускоряют процесс образования TTR-амилоида и являются наиболее важным фактором риска развития ATTR. Известно, что более 85 амилоидогенных вариантов TTR вызывают системный семейный амилоидоз. Мутации TTR обычно приводят к системному отложению амилоида с особым вовлечением периферической нервной системы, хотя некоторые мутации ассоциированы с кардиомиопатией или помутнением стекловидного тела. Ibid.

Мутация V30M является наиболее распространенной мутацией TTR. См., например, Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442. 3,9% афроамериканской популяции являются носителями мутации V122I, наиболее распространенной причины FAC. Jacobson, D.R. et al. (1997) *N. Engl. J. Med.* 336(7):466-73. По оценкам, SSA поражает более 25% населения в возрасте старше 80 лет. Westermarck, P. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(7): 2843-5.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в эффективных средствах лечения ассоциированных с TTR заболеваний.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, и композиции, нацеливающиеся на ген транстиретина (TTR). В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии TTR и способы лечения или предупреждения ассоциированного с TTR заболевания у субъекта с применением средств для RNAi, например двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению. Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что средства для RNAi, в которых, по сути, все нуклеотиды в смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и которые содержат не более 8 2'-фтор-модификаций в смысловой нити, не более 6 2'-фтор-модификаций в антисмысловой нити, две фосфотиоатные связи на 5'-конце смысловой нити, две фосфотиоатные связи на 5'-конце антисмысловой нити и лиганд, например лиганд GalNAc<sub>3</sub>, как показано в данном документе, являются эффективными для сайленсинга активности гена TTR. Эти средства демонстрируют удивительно повышенную активность сайленсинга гена TTR. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных модификаций и конкретных целевых участков в таких средствах для RNAi придает средствам для RNAi по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность и продолжительность действия.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии транстиретина (TTR) в клетке, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (IIIe):

смысловая нить: 5'-N<sub>a</sub>-YYY-N<sub>b</sub>-3',

антисмысловая нить: 3'-n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-5' (IIIe), где

n<sub>p</sub>' представляет собой выступающий конец из 2 нуклеотидов, и каждый нуклеотид в n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из N<sub>a</sub>, N<sub>bj</sub> N<sub>a</sub>' и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными либо немодифицированными или их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый из YYY и Y'Y'Y' независимо представляет собой один мотив с тремя идентичными модификациями в трех последовательных нуклеотидах.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. В одном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y имеют 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y' имеют 2'-О-метил-модификацию.

Двухнитевой участок может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-25 пар нуклеотидов, 23-27 пар нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов.

Каждая нить двухнитевого средства для RNAi может иметь 15-30 нуклеотидов или 19-30 нуклеоти-



и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U;

s представляет собой фосфотиоатную связь и

VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 6);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 8); и

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 9),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, C, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой миметик 5'-фосфата. В другом варианте осуществления смысловая и

антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, C, G или U;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U и

s представляет собой фосфотиоатную связь. В еще одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы из любых средств для RNAi, приведенных в любой из табл. 1 и 3. В еще одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой AD-65492.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии транстиретина (TTR) в клетке, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, полностью комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (IIIe):

смысловая нить: 5'-N<sub>a</sub>-YYY-N<sub>b</sub>-3',

антисмысловая нить: 3'-n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-5' (IIIe),

где

n<sub>p</sub>' представляет собой выступающий конец из 2 нуклеотидов, и каждый нуклеотид в n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 8-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными либо немодифицированными или их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый из YYY и Y'Y'Y' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

В настоящем изобретении также предусмотрены клетки, содержащие двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению, при этом клетки содержат векторы по настоящему изобретению, и фармацевтические композиции, содержащие двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению или векторы по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в незабуференном растворе, например, солевом растворе или воде.

В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят с буферным раствором. В одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы ингибирования экспрессии

транстиретина (TTR) в клетке.

Способы предусматривают (а) приведение клетки в контакт с двухнитевыми средствами для RNAi по настоящему изобретению, векторами по настоящему изобретению или фармацевтическими композициями по настоящему изобретению; и (b) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена TTR, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена TTR в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления субъект страдает ассоциированным с TTR заболеванием.

В одном варианте осуществления экспрессия TTR ингибируется по меньшей мере на приблизительно 10%, на приблизительно 15%, на приблизительно 20%, на приблизительно 25%, на приблизительно 30%, на приблизительно 40%, на приблизительно 50%, на приблизительно 60%, на приблизительно 70%, на приблизительно 80%, на приблизительно 90%, на приблизительно 95%, на приблизительно 98% или на приблизительно 100%.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR), путем введения субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению, или векторов по настоящему изобретению, или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития нарушения, ассоциированного с транстиретином (TTR), путем введения субъекту профилактически эффективного количества двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению, или векторов по настоящему изобретению, или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется профилактическое лечение субъекта.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития нарушения, ассоциированного с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту профилактически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению, или векторов по настоящему изобретению, или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается снижение, замедление или прекращение повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити пред-

ставляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы увеличения показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению, или векторов по настоящему изобретению, или фармацевтических композиций по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается увеличение показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы увеличения показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (IIIe):

смысловая нить: 5'-N<sub>a</sub>-YYY- N<sub>b</sub>-3',

антисмысловая нить: 3'-n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-5' (IIIe),

где:

n<sub>p</sub>' представляет собой выступающий конец из 2 нуклеотидов, и каждый нуклеотид в n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>a</sub>' и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными либо немодифицированными или их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый из YYY и Y'Y'Y' независимо представляет собой один мотив с тремя идентичными модификациями в трех последовательных нуклеотидах.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления субъектом является субъект, страдающий ассоциированным с TTR заболеванием. В другом варианте осуществления субъектом является субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания. В одном варианте осуществления субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания, имеет мутацию гена TTR, которая ассоциирована с развитием ассоциированного с TTR заболевания, или субъект имеет случай ассоциированного с TTR заболевания в семейном анамнезе, или у субъекта имеются признаки или симптомы, указывающие на развитие TTR-амилоидоза.

В одном варианте осуществления ассоциированное с TTR заболевание выбрано из группы, состоящей из старческого системного амилоидоза (SSA), системного семейного амилоидоза, семейной амилоидотической полинейропатии (FAP), семейной амилоидотической кардиомиопатии (FAC), лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС) и гипертироксинемии.

В одном варианте осуществления у субъекта имеется ассоциированный с TTR амилоидоз, и способ обеспечивает снижение отложения TTR-амилоида у субъекта.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутривентриального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, цереброспинального и любых их комбинаций. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством подкожного, внутримышечного или внутривенного введения. В еще одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством подкожного введения.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают осуществление оценки уровня экспрессии мРНК TTR или экспрессии белка TTR в образце, полученном от субъекта.

В одном варианте осуществления введение двухнитевого средства для RNAi не приводит к воспалительному ответу у субъекта, что оценивается на основании уровня цитокина или хемокина, выбранного из группы, состоящей из G-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12 (p70), IL1β, IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, TNFα и любой их комбинации, в образце от субъекта.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого

имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 12,5 мг до приблизительно 200 мг (например, приблизительно 12,5 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 или приблизительно 200 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития нарушения, ассоциированного с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 12,5 мг до приблизительно 200 мг (например, приблизительно 12,5 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 или приблизительно 200 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 0,15 до приблизительно 2,5 мг/кг (например, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,25 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 2,5 или приблизительно 3 мг/кг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития нарушения, ассоциированного с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг (например, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,25 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 2,5 или приблизительно 3 мг/кг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг (например, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,25 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 2,5 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить со-



держит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы увеличения показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг (например, приблизительно 0,15 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,25 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 2,5 или приблизительно 3 мг/кг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 500 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг (например, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 225, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250 мг, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 275, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно 320, приблизительно 325, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 375, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 425, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450 мг, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 475, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 525, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560, приблизительно 570, приблизительно 575, приблизительно 580, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития нарушения, ассоциированного с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 500 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг (например, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, при-

приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 225, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250 мг, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 275, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно 320, приблизительно 325, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 375, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 425, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450 мг, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 475, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 525, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560, приблизительно 570, приблизительно 575, приблизительно 580, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 500 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг (например, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 225, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 275, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно 320, приблизительно 325, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 375, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 425, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 475, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 525, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560, приблизительно 570, приблизительно 575, приблизительно 580, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы увеличения показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с транстиретином (TTR). Способы предусматривают введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 500 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 300 мг, от приблизительно 50 до приблизительно 300 мг, или от приблизительно 80 до приблизительно 300 мг (например, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 225, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 275, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно

но 320, приблизительно 325, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 375, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 425, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 475, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 525, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560, приблизительно 570, приблизительно 575, приблизительно 580, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг) двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный SEQ ID NO: 2 (5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3'), где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций; где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций; где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (IIIe):

смысловая нить: 5'-N<sub>a</sub>-YYY- N<sub>b</sub>-3',

антисмысловая нить: 3'-n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-5' (IIIe),

где

n<sub>p</sub>' представляет собой выступающий конец из 2 нуклеотидов, и каждый нуклеотид в n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из N<sub>a</sub>, N<sub>b</sub>, N<sub>b</sub> и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными либо немодифицированными или их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый из YYY и Y'Y'Y' независимо представляет собой один мотив с тремя идентичными модификациями в трех последовательных нуклеотидах.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

5'- usCfsuuggguacaugAfaaucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 6),

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7),

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 8), и

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 9),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, C, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U; s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuuggguacaugAfaaucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 6);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7);

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- UfsCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 8); и

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 9),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, C, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности:

5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga - 3' (SEQ ID NO: 10) и

5'- usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc - 3' (SEQ ID NO: 7),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) A, C, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь.

Фиксированную дозу двухнитевого средства для RNAi можно вводить субъекту один раз в прибли-

зительно 4 недели, в 5 недель, в шесть недель, в восемь недель или ежеквартально.

Дозу двухнитевого средства для RNAi можно вводить субъекту один раз в приблизительно 4 недели, в 5 недель, в шесть недель, в восемь недель или ежеквартально.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту приблизительно один раз в квартал.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту в течение длительного времени.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления субъектом является субъект, страдающий ассоциированным с TTR заболеванием. В другом варианте осуществления субъектом является субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания. В одном варианте осуществления субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания, имеет мутацию гена TTR, которая ассоциирована с развитием ассоциированного с TTR заболевания, или субъект имеет случай ассоциированного с TTR заболевания в семейном анамнезе, или у субъекта имеются признаки или симптомы, указывающие на развитие TTR-амилоидоза.

В одном варианте осуществления ассоциированное с TTR заболевание выбрано из группы, состоящей из старческого системного амилоидоза (SSA), системного семейного амилоидоза, семейной амилоидотической полинейропатии (FAP), семейной амилоидотической кардиомиопатии (FAC), лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС) и гипертироксинемии.

В одном варианте осуществления у субъекта имеется ассоциированный с TTR амилоидоз, и способ обеспечивает снижение отложения TTR-амилоида у субъекта.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, цереброспинального и любых их комбинаций. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством подкожного, внутримышечного или внутривенного введения. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту посредством подкожного введения, например, посредством самостоятельного введения, например, с помощью предварительно заполненного шприца или автоматического медицинского шприца.

В одном варианте осуществления способы дополнительно предусматривают осуществление оценки уровня экспрессии мРНК TTR или экспрессии белка TTR в образце, полученном от субъекта.

В одном варианте осуществления введение двухнитевого средства для RNAi не приводит к воспалительному ответу у субъекта, что оценивается на основании уровня цитокина или хемокина, выбранного из группы, состоящей из G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12 (p70), IL1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и любой их комбинации, в образце от субъекта.

В одном варианте осуществления средство, подходящее для применения в способах по настоящему изобретению, представляет собой AD-65492. AD-65492 можно вводить субъекту в течение длительного времени каждые 4 недели, каждые 5 недель, или каждые шесть недель, или каждый квартал.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для применения в ингибировании экспрессии транстиретина (TTR) в клетке. Средства включают в себя смысловую нить, комплементарную антисмысловую нить, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из любых нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 5.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для применения в ингибировании экспрессии транстиретина (TTR) в клетке. Средства включают в себя смысловую нить, комплементарную антисмысловую нить, при этом антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, представленных в табл. 6, где, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

Смысловая и антисмысловая нити могут содержать нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из любых нуклеотидных последовательностей, представленных в табл. 6 или 7.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для применения в ингибировании экспрессии транстиретина (TTR) в клетке, где средства для RNAi содержат смысловую нить, комплементарную антисмысловую нить, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) A, C, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U; и s представляет собой фосфотионатную связь.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы лечения субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием. Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 50 до приблизительно 300 мг двухнитевого средства для RNAi, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usCfsuugGfuuaAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; за счет чего осуществляется лечение субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы профилактического лечения субъекта, подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания. Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 300 мг двухнитевого средства для RNAi, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usCfsuugGfuuaAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; за счет чего осуществляется профилактическое лечение субъекта, подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания. Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 300 мг двухнитевого средства для RNAi, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usCfsuugGfuuaAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; за счет чего обеспечивается снижение, замедление или прекращение повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы увеличения показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания. Способы предусматривают введение субъекту дозы, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 300 мг двухнитевого средства для RNAi, где средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usCfsuugGfuuaAfcaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U; и s представляет собой фосфотиоатную связь; за счет чего обеспечивается увеличение показателя теста 6-минутной ходьбы (6MWT) у субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий стабильность указанных средств для RNAi в двадцатичетырехчасовом анализе стабильности в тритосомах.

Фиг. 2А представляет собой график, показывающий стабильность указанных средств для RNAi в двадцатичетырехчасовом анализе стабильности в цитозоле крыс, а фиг. 2В представляет собой график, показывающий стабильность указанных средств для RNAi в двадцатичетырехчасовом анализе стабильности в тритосомах.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют вариант V30M TTR человека (V30M hTTR), после введения одной подкожной дозы 1 мг/кг указанных средств для RNAi.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют V30M hTTR, после введения одной подкожной дозы 2,5 мг/кг ука-

занных средств для RNAi.

Фиг. 5 представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют V30M hTTR, после введения еженедельной дозы 2 мг/кг AD-65492 в течение трех недель (QWx3).

Фиг. 6А представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют V30M hTTR, после подкожного введения ежемесячной дозы 0,3 мг/кг указанных средств для RNAi в течение четырех месяцев (QMx4 в количестве 0,3 мг/кг). Фиг. 6В представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют V30M hTTR, после подкожного введения ежемесячной дозы 1 мг/кг указанных средств для RNAi в течение четырех месяцев (QMx4 в количестве 1 мг/кг). Фиг. 6С представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у трансгенных мышей, которые экспрессируют V30M hTTR, после подкожного введения ежемесячной дозы 3 мг/кг указанных средств для RNAi в течение четырех месяцев (QMx4 в количестве 3 мг/кг).

На фиг. 7 показана схема исследования подкожного введения AD-65492 и AD-66017 яванским макакам.

Фиг. 8А представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у яванских макаков после введения одной подкожной дозы 0,3 мг/кг указанных средств для RNAi. Фиг. 8В представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у яванских макаков после введения одной подкожной дозы 1 мг/кг AD-65492, одной подкожной дозы 1 мг/кг AD-66017 или одной подкожной дозы 2,5 мг/кг AD-51547. Фиг. 8С представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у яванских макаков после введения одной подкожной дозы 3 мг/кг AD-65492, одной подкожной дозы 3 мг/кг AD-66017 или одной подкожной дозы 5 мг/кг AD-51547.

Фиг. 9А представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у яванских макаков после введения ежемесячной подкожной дозы 1 мг/кг AD-65492 в течение четырех месяцев (QMx4), ежемесячной подкожной дозы 1 мг/кг AD-66017 в течение четырех месяцев (QMx4) или ежедневной дозы 5 мг/кг AD-51547 в течение пяти дней, а затем еженедельной дозы 5 мг/кг в течение четырех недель (QDx5, QWx4). Фиг. 9В представляет собой график, показывающий подавление экспрессии белка TTR у яванских макаков после введения ежемесячной подкожной дозы 3 мг/кг указанных средств для RNAi в течение четырех месяцев (QMx4).

Фиг. 10А представляет собой график, показывающий поддержание подавления экспрессии TTR путем подкожного введения ежемесячной дозы 1 мг/кг AD-65492 в течение четырех месяцев (QMx4; сплошная линия) по сравнению с подавлением экспрессии TTR после разовой подкожной дозы 1 мг/кг AD-65492 (пунктирная линия) у яванских макаков.

Фиг. 10В представляет собой график, показывающий суммарный эффект подкожного введения ежемесячной дозы 1 мг/кг AD-66017 в течение четырех месяцев (QMx4; сплошная линия) на подавление экспрессии белка TTR по сравнению с одной подкожной дозой 1 мг/кг AD-66017 (пунктирная линия) у яванских макаков.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий устойчивое подавление экспрессии TTR в сыворотке крови у яванских макаков после ежемесячного подкожного введения дозы 1 мг/кг AD-65492 в течение четырех месяцев (QMx4) или ежемесячного подкожного введения дозы 3 мг/кг AD-65492 в течение четырех месяцев (QMx4) по сравнению с одной подкожно введенной дозой 1 мг/кг AD-65492 или одной подкожно введенной дозой 0,3 мг/кг AD-65492.

На фиг. 12 показана схема исследования подкожного введения AD-65492 яванским макакам.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий устойчивое подавление экспрессии TTR в сыворотке крови у яванских макаков после ежемесячного подкожного введения дозы 0,3 мг/кг AD-65492 в течение шести месяцев (QMx6) или ежемесячного подкожного введения дозы 0,6 мг/кг AD-65492 в течение шести месяцев (QMx6) или введения одной начальной дозы 1 мг/кг AD-65492 (QMx1) с последующим введением ежемесячной дозы 0,3 мг/кг AD-65492, начиная с дня 28 после начала ведения начальной дозы в течение пяти месяцев (QMx5).

#### Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрены средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, и композиции, нацеливающиеся на ген транстиретина (TTR). В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии TTR и способы лечения или предупреждения ассоциированного с TTR заболевания у субъекта с применением средств для RNAi, например, двухнитевых средств для RNAi по настоящему изобретению. Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что средства для RNAi, в которых, по сути, все нуклеотиды в смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды и которые содержат не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити, не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5

2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в антисмысловой нити, две фосфотиоатные связи на 5'-конце смысловой нити, две фосфотиоатные связи на 5'-конце антисмысловой нити и лиганд, например, лиганд GalNAc3, как показано в данном документе, эффективны для селективного сайленсинга активности гена TTR. Эти средства демонстрируют удивительно повышенную активность сайленсинга гена TTR. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных модификаций и конкретных целевых участков в таких средствах для RNAi придает средствам для RNAi по настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность и продолжительность действия.

В следующем подробном описании раскрывается то, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для селективного ингибирования экспрессии гена TTR, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов с заболеваниями и нарушениями, на которые будут оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии гена TTR.

#### I. Определения

Для более легкого понимания настоящего изобретения сперва приведены определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях перечисления значения или диапазона значений параметра подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

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

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

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

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

Как используется в данном документе, "транстиретин" ("TTR") относится к хорошо известному гену и белку. TTR также известен как преальбумин, HsT2651, PALB и TBPA. TTR функционирует как транспортер ретинолсвязывающего белка (RBP), тироксина (T4) и ретинола, а также действует как протеаза. Печень секретирует TTR в кровь, а сосудистое сплетение секретирует TTR в спинномозговую жидкость. TTR также экспрессируется в поджелудочной железе и пигментном эпителии сетчатки. Наибольшая клиническая значимость TTR заключается в том, что как нормальный, так и мутантный белок TTR может образовывать амилоидные фибриллы, которые объединяются во внеклеточные отложения, приводя к амилоидозу. См., например, Saraiva M.J.M. (2002) Expert Reviews in Molecular Medicine, 4(12):1-11 для обзора. Молекулярное клонирование и нуклеотидная последовательность транстиретина крысы, а также распределение экспрессии мРНК были описаны Dickson, P.W. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260(13):8214-8219. Рентгеновская кристаллическая структура TTR человека была описана в Blake, C. C. et al. (1974) J Mol Biol 88, 1-12. Последовательность транскрипта мРНК TTR человека можно найти в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) под номером доступа для эталонной последовательности (RefSeq) NM\_000371 (например, SEQ ID NO: 1 и 5). Последовательность мРНК TTR мыши можно найти под номером доступа RefSeq NM\_013697.2, и последовательность мРНК TTR крысы можно найти под номером доступа RefSeq NM\_012681.1. Дополнительные примеры последовательностей мРНК TTR легко доступны в общедоступных базах данных, например, в GenBank, UniProt и OMIM.

Как используется в данном документе, "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена TTR, в том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной для того, чтобы служить в качестве субстрата для управляемого iRNA расщепления в этой части или рядом с этой частью нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в процессе транскрипции гена TTR. В одном варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах кодирующего белок участка гена TTR. В другом варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах 3'-UTR гена TTR.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-

23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 30 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина целевой последовательности составляет от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность гена TTR содержит нуклеотиды 615-637 из SEQ ID NO: 1 или нуклеотиды 505-527 из SEQ ID NO: 5 (т.е. 5'-GATGGGATTTTCATGTAACCAAGA-3'; SEQ ID NO: 4).

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

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

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфичным в отношении последовательности разрушением мПНК посредством процесса, который известен как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию гена TTR в клетке, например клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мПНК TTR, управляя расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрушается до двухнитевых коротких интерферирующих РНК (siRNA), содержащих смысловую нить и антисмысловую нить, эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг этих dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). Эти siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мПНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой siRNA (ssRNA) (антисмысловой нити дуплекса siRNA), образующейся внутри клетки, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т.е. гена TTR. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

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



чески модифицирована способами, описанными в Lima et al., (2012) Cell 150:883-894.

В другом варианте осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК, и в данном документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и, по сути, комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. гену TTR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например, мРНК, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемый в настоящем описании термин "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов.

Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеотидное основание. Таким образом, выражение "модифицированный нуклеотид" охватывает замены, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеотидных основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области. Любые такие модификации, как используемые в молекуле типа siRNA, охвачены термином "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая позволяет осуществлять специфическое разрушение требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, при этом его длина может находиться в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например его длина может составлять приблизительно 15-30 пар оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как, например: приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК, или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, если две нити являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительную цепь РНК называют петлей типа "шпилька". Петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или больше неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может составлять 10 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может составлять 8 или менее неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может составлять 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может составлять 4-8 нуклеотидов.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA, длина каждой нити которой составляет 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целе-

вой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью мРНК TTR, управляя расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al. (2001) Genes Dev. 15:188). В одном варианте осуществления средства для RNAi по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна нить средства для RNAi содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-конец одной нити средства для RNAi содержит выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой средство на основе dsRNA, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК TTR, управляя расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной под названием Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, et al. (2001) Nature 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al. (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al. (2001) Genes Dev. 15:188). В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с последовательностью РНК TTR, управляя расщеплением целевой РНК.

Используемый в данном документе термин "нуклеотидный выступающий конец" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры iRNA, например dsRNA. Например, если 3'-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, то образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA может содержать выступающий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; альтернативно выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него.

Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Более того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA. В одном варианте осуществления dsRNA по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна нить средства для RNAi содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 5'-выступающий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-конец одной нити средства для RNAi содержит выступающий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая нить dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидиофосфатом.

В определенных вариантах осуществления выступающий конец в пределах смысловой нити или антисмысловой нити, или обеих, может содержать удлиненные отрезки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В опре-

деленных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует в пределах смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует в пределах антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов выступающего конца заменены нуклеозидтиофосфатом. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухнитевого средства для RNAi отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т.е. отсутствует нуклеотидный выступающий конец. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей своей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступающего конца на любом конце молекулы.

Средства для RNAi по настоящему изобретению предусматривают средства для RNAi с нуклеотидными выступающими концами на одном конце (т.е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступающими концами на обоих концах.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например, dsRNA, которая содержит участок, по сути комплементарный целевой последовательности, например, мРНК TTR. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку на антисмысловой нити, по сути, комплементарному последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности TTR, которая определена в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, во внутренних или концевых участках молекулы могут присутствовать ошибки спаривания. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида 5'- и/или 3'-конца iRNA. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению предусматривает ошибочное спаривание нуклеотидов в смысловой нити. В одном варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-конца iRNA. В другом варианте осуществления ошибочное спаривание нуклеотидов происходит, например, по 3'-концевому нуклеотиду iRNA.

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

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом в мишени, по которому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

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

Комплементарные последовательности в iRNA, например, в dsRNA, описанной в данном документе, предусматривают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, и олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последова-

тельностью. В данном документе такие последовательности могут называться "полностью комплементарными" по отношению друг к другу. Тем не менее, если в данном документе первую последовательность называют "практически комплементарной" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может происходить ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса размером до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако когда два олигонуклеотида сконструированы с тем, чтобы образовывать при гибридизации один или несколько однонитевых выступающих концов, то такие выступающие концы не будут считаться несовпадениями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

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

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

Как используется в данном документе, полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который, по сути, комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген TTR). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК TTR, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей ген TTR.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности TTR. В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны SEQ ID NO: 2 (5' - UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA - 3').

В одном варианте осуществления антисмысловая полинуклеотидная последовательность представляет собой 5' - UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC - 3' (SEQ ID NO: 3).

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, по сути, комплементарны целевой последовательности TTR и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 2 (5' - UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA - 3') или фрагмента любой из SEQ ID NO: 1, 2 и 5, как, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя смысловую нить, которая, по сути, комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности TTR, и при этом полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из последовательностей, представленных в табл. 1, 3, 5, 6 и 7, как, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В другом варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению включает в себя антисмысловую нить, которая, по сути, комплементарна целевой последовательности TTR и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из последовательностей, представленных в таблице 1 и 3, как, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%,

на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В некоторых вариантах осуществления большинство нуклеотидов каждой нити являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также включать в себя один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "iRNA" может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут предусматривать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области. Любые такие модификации, которые используются в молекуле iRNA, охватываются термином "iRNA" в контексте данных описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой молекулу одонитевой антисмысловой нуклеиновой кислоты, которая ингибирует целевую мРНК посредством механизма антисмыслового ингибирования. Молекула одонитевой антисмысловой РНК комплементарна последовательности в целевой мРНК. Одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с мРНК и физического нарушения механизма трансляции, см. Dias, N. et al. (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Молекула одонитевой антисмысловой РНК может иметь длину, составляющую от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, и иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одонитевой антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

"Ассоциированное с TTR заболевание", как используется в данном документе, подразумевают как включающее любое заболевание, ассоциированное с геном или белком TTR. Такое заболевание может быть вызвано, например, избыточной выработкой белка TTR, мутациями гена TTR, аномальным расщеплением белка TTR, аномальными взаимодействиями между TTR и другими белками или другими эндогенными или экзогенными веществами. "Ассоциированное с TTR заболевание" включает любой тип TTR-амилоидоза (ATTR), где TTR играет роль в образовании аномальных внеклеточных агрегатов или отложений амилоида. Ассоциированные с TTR заболевания включают старческий системный амилоидоз (SSA), системный семейный амилоидоз, семейную амилоидотическую полинейропатию (FAP), семейную амилоидотическую кардиомиопатию (FAC), лептоменингеальный амилоидоз/амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС), амилоидотическое помутнение стекловидного тела, синдром запястного канала и гипертироксинемия. Симптомы TTR-амилоидоза включают сенсорную нейропатию (например, парестезию, гипестезию в дистальных отделах конечностей), вегетативную нейропатию (например, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, такое как язва желудка, или ортостатическая гипотензия), моторную нейропатию, судороги, деменцию, миелопатию, полинейропатию, синдром запястного канала, вегетативную недостаточность, кардиомиопатию, помутнение стекловидного тела, почечную недостаточность, нефропатию, существенно уменьшенный mBMI (модифицированный индекс массы тела), нарушение функции черепно-мозговых нервов и решетчатую дегенерацию роговицы.

## II. iRNA по настоящему изобретению

В настоящем изобретении предусмотрены iRNA, которые селективно ингибируют экспрессию одного или нескольких генов TTR. В одном варианте осуществления средство на основе iRNA включает молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена TTR в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, у которого имеется ассоциированное с TTR заболевание. dsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии гена TTR. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, длина составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген TTR, iRNA селективно ингибирует экспрессию гена TTR (например, гена TTR человека, примата, отличного от примата животного или птицы) по меньшей мере на приблизительно 10%, что установлено при помощи, например, ПЦР или способа с использованием разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа на основе анализа белков, как например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который, по сути, комплементарен обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена TTR. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити таким образом, что две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно в данной области, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы

нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично, длина участка комплементарности для целевой последовательности составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, длина составляет 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Значения диапазона и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше значениям диапазона и длины, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления длина dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов или длина составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно в данной области, dsRNA, длина которых составляет более приблизительно 21-23 нуклеотидов, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Специалисту в данной области также будет понятно, что участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы мРНК. В соответствующих случаях "частью" целевой мРНК является непрерывная последовательность целевой мРНК, имеющая длину, достаточную для того, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного расщепления (т.е. расщепления посредством пути с участием RISC).

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

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или несколько однонитевых нуклеотидных выступающих концов, например из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут характеризоваться неожиданно более высокими ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(выступающие) конец(концы) может(могут) находиться в пределах смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Более того, нуклеотид(нуклеотиды) выступающего конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой нити dsRNA. В определенных вариантах осуществления возможны более длинные, удлиненные выступающие концы.

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

Соединения на основе iRNA по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Во-первых, отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают раздельно. Затем составляющие нити отжигают. Отдельные нити соединения на основе siRNA можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Органический синтез дает преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Однонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синте-

за или их обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, а соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей, по сути, комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена TTR. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7. В одном варианте осуществления, по сути, комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления, по сути, комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что хотя некоторые из последовательностей, представленных в табл. 1, 3, 5, 6 и 7, описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в табл. 1, 3, 5, 6 и 7, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано в них.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, приведенных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить, длина которой составляет как минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предположить, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей из любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть эффективными, аналогично описанному выше dsRNA. Следовательно, dsRNA с последовательностью из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей из любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена TTR не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, приведенные в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте TTR, которые являются восприимчивыми к опосредованному RISC расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены iRNA, которые целенаправленно воздействуют на один из этих сайтов. Применимо к данному документу говорят, что iRNA целенаправленно воздействует на конкретный сайт РНК-транскрипта, если iRNA способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене TTR.

При том, что длина целевой последовательности, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов, существует широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, предоставляют руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, *in silico*), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Постепенно перемещая "окно" последовательности на один нуклеотид выше или ниже исходного положения целевой последовательности, можно идентифицировать следующую потенциальную целевую последовательность, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого заданного выбранного целевого размера. С помощью этого способа в сочетании с системным синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, описанных в данном документе или известных в данной области) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством на основе iRNA опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, при том, что идентифицированные последовательности, например, в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, представляют собой эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительная оптимизация эффективности

ингибирования может быть достигнута путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно заданных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Помимо этого, также предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7, дополнительная оптимизация может быть достигнута путем систематического добавления либо удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей и тестирования этих последовательностей, полученных путем перемещения окна, более длинного или более короткого по размеру, выше или ниже относительно целевой РНК в данной точке. Также результатом объединения этого подхода для получения новых мишеней-кандидатов вместе с тестированием эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном в данной области или описанном в данном документе, могут быть дополнительные улучшения в эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, посредством введения модифицированных нуклеотидов, описанных в данном документе или известных из уровня техники, добавления или изменений выступающего конца или других модификаций, известных из уровня техники и/или обсуждаемых в данном документе, для дополнительной оптимизации молекулы (например, для повышения стабильности в сыворотке крови или периода полужизни в кровотоке, повышения термостабильности, улучшения трансмембранной доставки, нацеливания на конкретное местоположение или тип клеток, повышения степени взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, повышения высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

iRNA, как описано в данном документе, может содержать одну или несколько ошибок спаривания с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления iRNA, описанная в данном документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область ошибочного спаривания находилась не в центре участка комплементарности. Если антисмысловая нить iRNA содержит ошибки спаривания с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы ошибка спаривания была ограничена в пределах последних 5 нуклеотидов либо от 5'-, либо от 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов нить, комплементарная участку гена TTR, обычно не содержит любой ошибки спаривания в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные из уровня техники, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибку спаривания с целевой последовательностью, эффективной в ингибировании экспрессии гена TTR. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания при ингибировании экспрессии гена TTR является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене TTR имеет полиморфную изменчивость последовательности в популяции.

### III. Модифицированные iRNA по настоящему изобретению

В одном варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению практически все из нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления, по сути, все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными, и при этом iRNA содержит не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити и не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в антисмысловой нити. В других вариантах осуществления, по сути, все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными, и при этом iRNA содержит не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити и не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в антисмысловой нити. iRNA по настоящему изобретению, в которых "по сути, все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки. Модификации предусматривают, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование,



конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгирование оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара и/или модификации остова, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений на основе iRNA, применимых в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не встречающиеся в природе межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей данного описания и как иногда упоминается в данной области модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокислотфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокислотфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, сложные тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их аналоги с 2'-5'-связями, а также таковые с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение вышеупомянутых содержащих фосфор связей, включают в себя без ограничения патенты

США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243;  
5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131;  
5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126;  
5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050;  
6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603;  
6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167;  
6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029

и патентный документ США RE39464, полное содержание которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразинные остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеупомянутых олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты

США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134;  
5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677;  
5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046;  
5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439,

полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие миметики РНК для применения в iRNA, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности аминокислотглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и связываются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупа амидной части остова. Иллю-

стративные патенты США, в которых изложена идея получения соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, предусматривают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>-- [известный как метилен (метиляминовый) или MMI-остов], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- и --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>-- [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как --O--P--O--CH<sub>2</sub>--] согласно вышеупомянутому патенту США № 5489677 и амидные остовы согласно вышеупомянутому патенту США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова согласно вышеупомянутому патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать 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 замещенными или незамещенными C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкилом или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат одно из следующего в 2'-положении: низший C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группу для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает в себя 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа iRNA, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты

США №№ 4981957;

5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785;

5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053;

5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920,

некоторые из которых принадлежат авторам настоящей заявки. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа iRNA по настоящему изобретению также может содержать модификации или замещения нуклеотидного основания (часто называемого в данной области просто как "основание"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают в себя другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают такие, которые раскрыты в патенте США № 3687808, такие, которые раскрыты в Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; такие, которые раскрыты в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, такие, которые раскрыты в Englisch et al., Angewandte Che-

mie, International Edition, 1991, 30, 613, и такие, которые раскрыты в Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-О-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения определенных из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают без ограничения вышеупомянутые патенты

США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273;  
5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711;  
5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692;  
6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640;  
6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088,

полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

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

несколько бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненный этилом" или "сEt") и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., J. Отд. Chem., 2009, 74, 118-134) и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации патентов США, в которых изложена идея получения нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие патенты

США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499;  
6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686;  
7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US  
2008/0039618 и US 2009/0012281,

полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Какой-либо из вышеизложенных бициклических нуклеозидов можно получить с имеющим одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, в том числе, например, α-L-рибофуранозой и β-D-рибофуранозой (см. WO 99/14226).

РНК из числа iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в данном документе "затрудненный этилом нуклеотид" или "сEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, называемой в данном документе "S-сEt".

iRNA по настоящему изобретению может также содержать один или несколько "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2'- и C4'-атомы углерода рибозы или C3'- и C5'-атомы углерода рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильную конформацию и повышает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для помещения атома кислорода в оптимальное положение для стабильности и аффинности, что приводит в результате к меньшему "сморщиванию" рибозного кольца.

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

Один или несколько нуклеотидов iRNA по настоящему изобретению также могут включать гидроксиметилзамещенный нуклеотид. "Гидроксиметилзамещенный нуклеотид" представляет собой ациклический 2'-3'-секонуклеотид, также известный как модификация под названием "незапертая нуклеиновая кислота" ("UNA").

Иллюстративные публикации США, в которых изложена идея получения UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

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

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

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы по настоящему изобретению

В определенных аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению включают химические модификации, раскрытые, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в РСТ/US 2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, тогда активность средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е., гена TTR) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для RNAi может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для RNAi". Длина дуплексного участка средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере дуплексный участок выбран по длине из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или копирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может составлять 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Наличие выступающих концов может быть обусловлено тем, что одна нить длиннее другой,

или может быть обусловлено тем, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других не содержащих основания линкеров.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе без ограничения с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (T), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для RNAi могут быть фосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления выступающий(ие) участок(и) содержит(ат) два нуклеотида с фосфотиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления выступ присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити.

В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. В одном варианте осуществления все нуклеотиды iRNA по настоящему изобретению являются модифицированными, и при этом iRNA содержит не более 8 2'-фтор-модификаций (например, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в смысловой нити и не более 6 2'-фтор-модификаций (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций) в антисмысловой нити. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi с дуплексным участком, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой нити находится обычно около положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12

положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1<sup>го</sup> нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка средства для RNAi от 5'-конца.

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может иметь по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены так, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированными. Каждый нуклеотид может быть модифицированным одинаковыми или разными модификациями, которые могут предусматривать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных с фосфатом атомов кислорода и/или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксиль в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфорилированными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера модификация может находиться только в 3'- или 5'-концевом положении, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может находиться в двухнитевом участке, в одонитевом участке или в обоих. Модификация может находиться только в двухнитевом участке РНК или может находиться только в одонитевом участке РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении не образующего связь атома О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухнитевом и одонитевом участках, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в одонитевые выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут предусматривать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с помощью модификаций, известных из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-О-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификаций фосфатной группы, например, фосфотиоатных модификаций. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксид, 2'-гидроксидом или 2'-фтором. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут быть 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями или другими.

В одном варианте осуществления N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> содержат модификации чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

"АВАВАВАВАВАВ...",

"ААВВААВВААВВ...",

"ААВААВААВААВ...",

"АААВАААВАААВ...", "АААВВВВВВВВВВ..." 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, то чередующиеся паттерны, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловых нити или антисмысловых нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как например: "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т. д.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой нити, сдвинутый относительно паттерна модификаций для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и vice versa. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В одном варианте осуществления средство для RNAi изначально имеет сдвиг паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити относительно паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид смысловой нити образует пару оснований с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и наоборот. Положение 1 в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловой нити может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает исходный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити и/или антисмысловой нити. Такое нарушение паттерна модификаций смысловой и/или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданно повышает активность сайленсинга генов в отношении целевого гена.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего после мотива, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>YYYN<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего после мотива "YYY", которая отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или разными модификациями. В качестве альтернативы N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

Средство для RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может присутствовать у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может присутствовать у каждого нуклеотида смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может присутствовать в чередующемся паттерне в смысловой нити и/или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В одном варианте осуществления средство для RNAi имеет модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, участок выступающего конца может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплекса-

ного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, после которого следует выступающий нуклеотид. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида. Эти три концевые нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим после выступающего нуклеотида.

Необязательно средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит ошибочное(ошибочные) спаривание(спаривания) с мишенью, в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в участке выступающего конца или в дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать на основе их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар по отдельности для каждой пары оснований, однако также можно использовать анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других частях данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических, или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

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

В одном варианте осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I):

$$5' \text{ } n_p\text{-Na-(X X X )i-Nb-Y Y Y -Nb-(Z Z Z )j-Na-n_q \text{ } 3' \text{ (I)}$$

где

каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из p и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждый  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где  $N_b$  и Y имеют неодинаковую модификацию; и

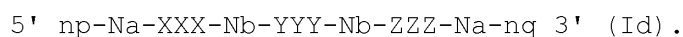
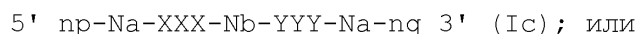
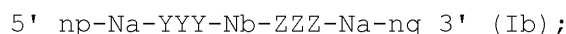
каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

В одном варианте осуществления  $N_a$  и/или  $N_b$  содержит модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или около него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.



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



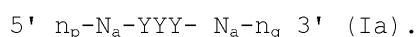
В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib), тогда  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

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

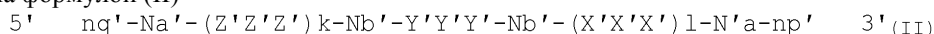
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

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



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

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



где

каждый из k и l независимо равняется 0 или 1;

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

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

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

каждый  $n_p'$  и  $n_q'$  независимо представляют собой выступающий нуклеотид;

где  $N_b'$  и Y' имеют неодинаковую модификацию; и

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

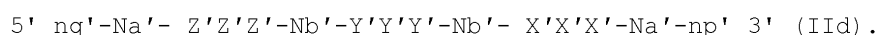
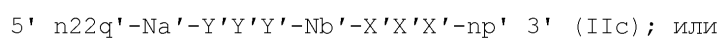
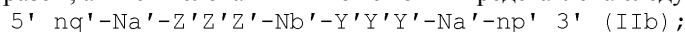
В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  содержит модификации чередующегося паттерна.

Мотив Y'Y'Y' находится на сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, то мотив Y'Y'Y' может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца. Предпочтительно мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления в мотиве Y'Y'Y' все нуклеотиды 2'-ОМе-модифицированы.

В одном варианте осуществления k равняется 1, а l равняется 0, или k равняется 0, а l равняется 1, или k и l равняются 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:



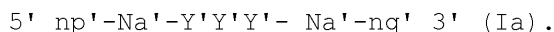
В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIc),  $N_b'$  представляет собой оли-

гонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (II<sub>d</sub>), каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно  $N_b$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

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



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (II<sub>a</sub>), каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

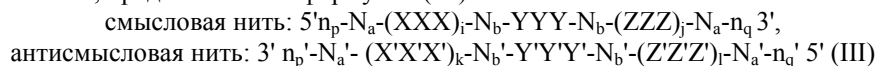
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$ , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y$  представляет собой 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и  $Y'$  представляет собой 2'-О-метил-модификацию.

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

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



где

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

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

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

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

где каждый из  $n_p$ ,  $n_p$ ,  $n_q$  и  $n_q$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

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

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

Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже

$$5' \text{ np} - \text{Na} - \text{Y} \text{ Y} \text{ Y} - \text{Na} - \text{nq} \text{ } 3'$$

$$3' \text{ np}' - \text{Na}' - \text{Y}' \text{ Y}' \text{ Y}' - \text{Na}' - \text{nq}' \text{ } 5'$$

(IIIa)

$$5' \text{ np} - \text{Na} - \text{Y} \text{ Y} \text{ Y} - \text{Nb} - \text{Z} \text{ Z} \text{ Z} - \text{Na} - \text{nq} \text{ } 3'$$

$$3' \text{ np}' - \text{Na}' - \text{Y}' \text{ Y}' \text{ Y}' - \text{Nb}' - \text{Z}' \text{ Z}' \text{ Z}' - \text{Na}' - \text{nq}' \text{ } 5'$$

(IIIb)

$$5' \text{ np} - \text{Na} - \text{X} \text{ X} \text{ X} - \text{Nb} - \text{Y} \text{ Y} \text{ Y} - \text{Na} - \text{nq} \text{ } 3'$$

$$3' \text{ np}' - \text{Na}' - \text{X}' \text{ X}' \text{ X}' - \text{Nb}' - \text{Y}' \text{ Y}' \text{ Y}' - \text{Na}' - \text{nq}' \text{ } 5'$$

(IIIc)

$$5' \text{ np} - \text{Na} - \text{X} \text{ X} \text{ X} - \text{Nb} - \text{Y} \text{ Y} \text{ Y} - \text{Nb} - \text{Z} \text{ Z} \text{ Z} - \text{Na} - \text{nq} \text{ } 3'$$

$$3' \text{ np}' - \text{Na}' - \text{X}' \text{ X}' \text{ X}' - \text{Nb}' - \text{Y}' \text{ Y}' \text{ Y}' - \text{Nb}' - \text{Z}' \text{ Z}' \text{ Z}' - \text{Na}' - \text{nq}' \text{ } 5'$$

(IIId)

$$5' - \text{Na} - \text{Y} \text{ Y} \text{ Y} - \text{Nb} - 3'$$

$$3' \text{ np}' - \text{Na}' - \text{Y}' \text{ Y}' \text{ Y}' - \text{Nb}' - 5'$$

(IIIe)

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

Когда средство для RNAi представлено формулой (IIIe), каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными либо немодифицированными или их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида.

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

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), (IIId) и (IIIe), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc) или (IIId), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В одном варианте осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификация нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации  $N_a$

представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/11768 6, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Как описано более подробно ниже, средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном 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 несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или, как правило, связи, доступной для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, серосодержащий, остов, и подходящей для этого рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть например, углеводом, например, моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель во многих случаях будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, в состав кольца.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; при этом предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ацик-

лическая группа выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, представляющего собой диэтаноламин.

В определенных конкретных вариантах осуществления средство для RNAi, например, для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 и 7. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению выбрано из группы, состоящей из AD-66016, AD-65492, AD-66017 и AD-66018.

#### IV. iRNA, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК из числа iRNA по настоящему изобретению предусматривает химическое связывание РНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, распределение в клетках или поглощение iRNA клетками. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), простой тиоэфир, например, берил-Б-третилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), 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), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) или октадециламиноновый или гексиламинокарбонилхлестеринный фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

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

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновую кислоту) или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактоида и гликолида, сополимер простого дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиамин-псевдопептид, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающее на клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например клеткой почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, моновалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин А, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида. В определенных вариантах осуществления лиганды включают моновалентную или поливалентную галактозу. В определенных вариантах осуществления лиганды включают холестерин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафрин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-

(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокеркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu<sup>3+</sup> тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

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

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение средства на основе iRNA клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к iRNA, как описано в данном документе, и действует как фармакокинетический модулятор (РК-модулятор). РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, следовательно, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остовах, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). В дополнение, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, как, например, полученного в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют с наличием любой из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать с помощью удобного и стандартного способа хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуется несколькими фирмами-производителями, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные в данной области. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды и молекула-лиганд, несущая специфичные в отношении последовательности связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников конъюгатов с нуклеотидом или нуклеозидом, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников нуклеотида-лиганда или конъюгата с нуклеозидом, которые уже несут молекулу-лиганд, или структурных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

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

#### А. Конъюгаты с липидами

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочти-

тельно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевой ткани, например, в отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (б) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, и/или (с) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком например, HSA.

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

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

В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почку. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать в дополнение к лиганду на основе липида или вместо него.

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

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство, обеспечивающее проникновение в клетку. Предпочтительно средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, в том числе представлять собой пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, а также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазами.

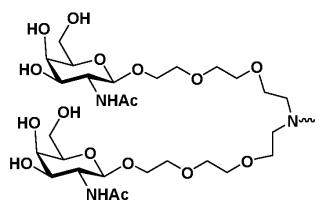
Лигандом может быть пептид или пептидомиметик.

Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной укладываться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к средствам на основе iRNA может повлиять на фармакокинетическое распределение iRNA, например, путем повышения степени клеточного распознавания и абсорбции. Длина фрагмента пептида или пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

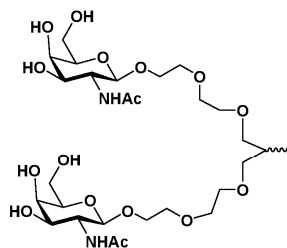
Пептидом или пептидомиметиком может быть, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Туг, Тгр или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 11). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 12), содержащий гидрофобную MTS, также может являться нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, как было обнаружено, последовательности Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO: 13) и белка Antennapedia дрозофилы (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 14) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или



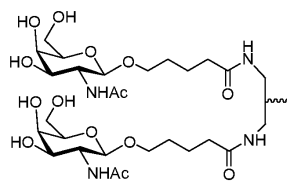




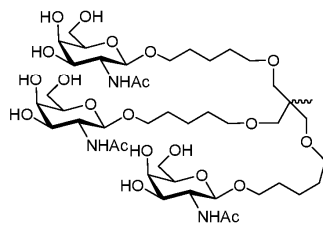
формула IV,



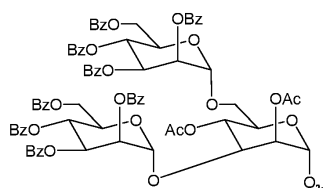
формула V,



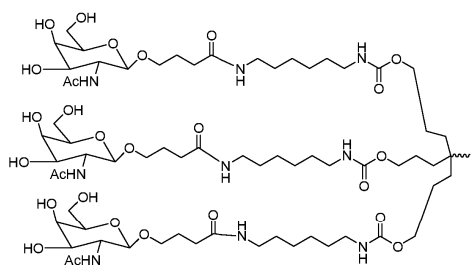
формула VI,



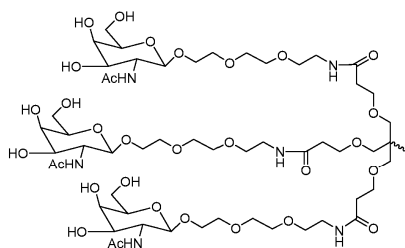
формула VII,



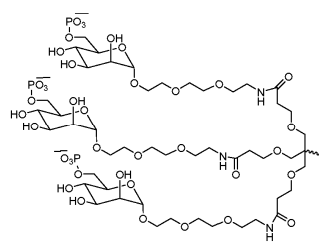
формула VIII,



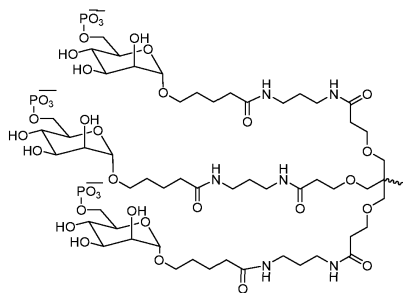
формула IX,



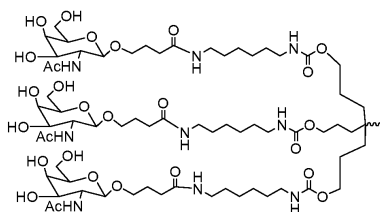
формула X,



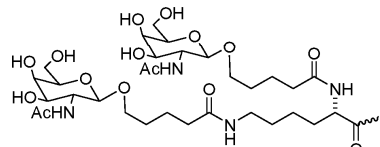
формула XI,



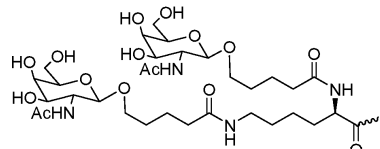
формула XII,



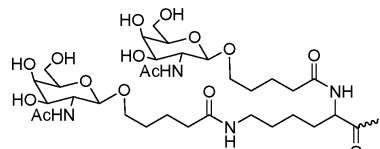
формула XIII,



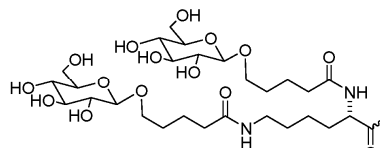
формула XIV,



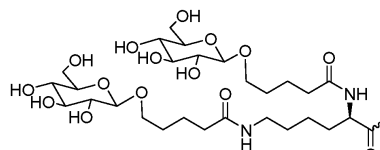
формула XV,



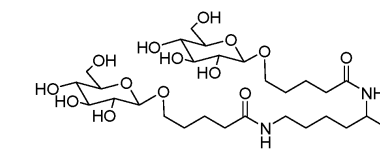
формула XVI,



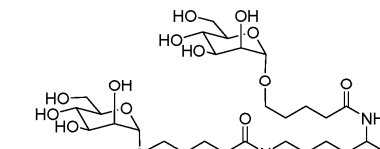
формула XVII,



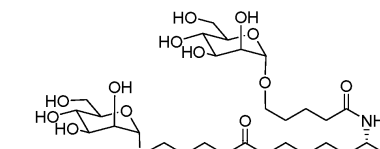
формула XVIII,



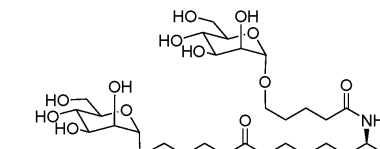
формула XIX,



формула XX,

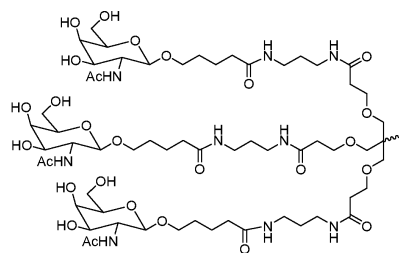


формула XXI,



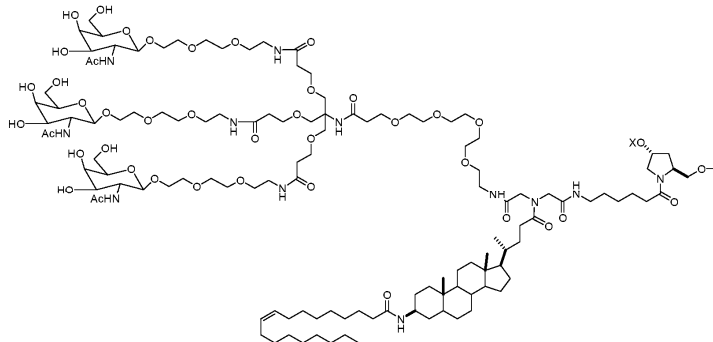
формула XXII.

В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



формула II.

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



(формула XXIII),

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

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

В одном варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенные средству на основе iRNA. В другом варианте осуществления двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, при этом каждый независимо присоединен к множеству нуклеотидов двухнитевого средства для RNAi посредством множества одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, если две нити средства на основе iRNA по настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующей петлю типа "шпилька", содержащую множество неспаренных нуклеотидов, то каждый неспаренный нуклеотид в петле типа "шпилька" может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные посредством одновалентного линкера. Петля типа "шпилька" также может быть образована удлиненным выступающим концом в одной нити дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводов дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, как описано выше, таких как без ограничения РК-модулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

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

#### D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду iRNA различными линкерами, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, связывает ковалентными связями две части соединения. Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, единицу, такую как NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH, или цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклизалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкиларилалкил, алкиларилалкил, алкиларилалкил.

кенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в котором один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенным или незамещенным гетероциклил; где R<sub>8</sub> представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический компонент. В одном варианте осуществления линкер состоит из приблизительно 1-24 атомов, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при проникновении в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в приблизительно 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или по меньшей мере в приблизительно 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором стандартном условии (которое можно, например, выбрать для имитации или моделирования условий, свойственных крови или сыворотке крови).

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

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к значению pH. Значение pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как среднее значение pH внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением pH, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного pH, высвобождая тем самым катионный липид из лиганда внутри клетки или в требуемый компартмент клетки.

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

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

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы может быть оценена с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое выбирают в качестве показателя расщепления в целевой клетке, а второе выбирают в качестве показателя расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно произвести первичные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50,

60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i) Расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерные группы

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидат может быть оценен путем инкубирования с дитиотрептолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, целевой клетке. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке крови. В одном варианте осуществления кандидатные соединения расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере в приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в *in vitro* условиях, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или *in vitro* условиями, выбранными для имитации внеклеточных условий). Степень расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii) Фосфатные расщепляемые линкерные группы

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S- Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii) Расщепляемые кислотой линкерные группы

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить расщепляющую среду для расщепляемых кислотами линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iv) Сложноэфирные линкерные группы

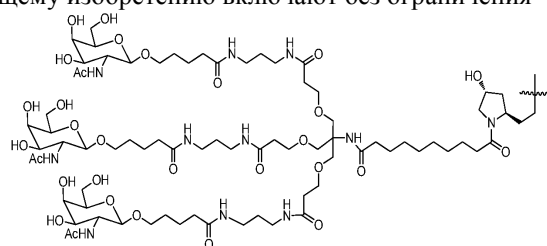
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную линкерную группу. Расщепляемая сложноэфирная линкерная группа расщепляется в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

v) Пептидные расщепляемые группы

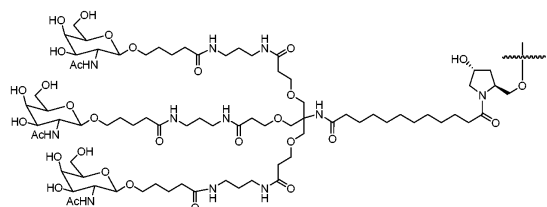
В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, три-

пептидов и т.д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу ( $-C(O)NH-$ ). Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образующейся между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-NHCHRA(CO)NHCHRB(CO)-$ , где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с помощью способов, аналогичных описанным выше.

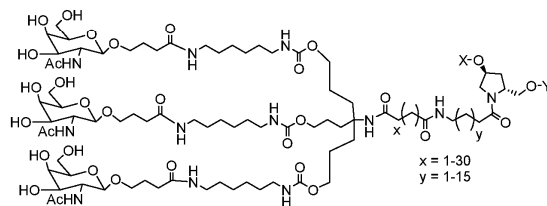
В одном варианте осуществления iRNA по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов iRNA с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению включают без ограничения



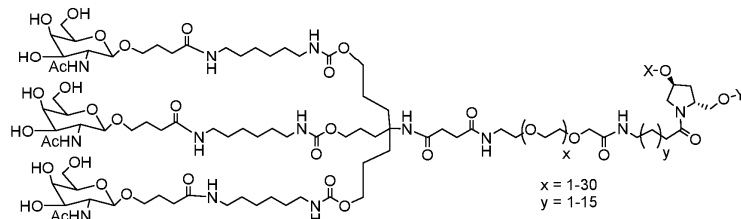
(формула XXIV),



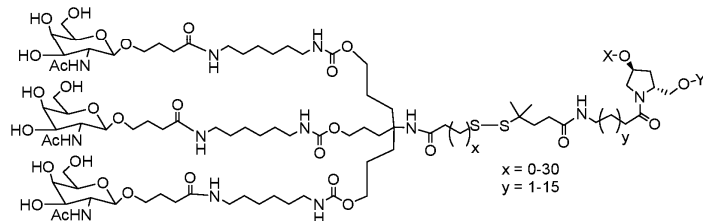
(формула XXV),



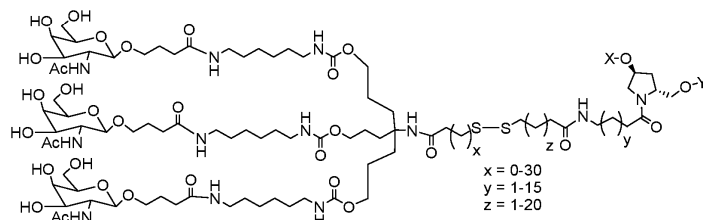
(формула XXVI),



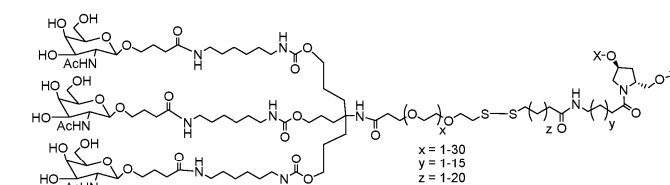
(формула XXVII),



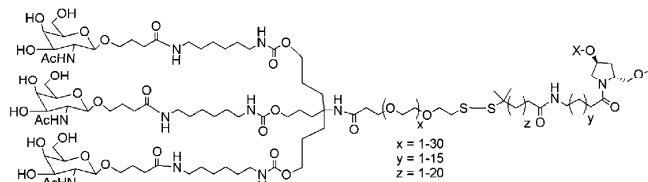
(формула XXVIII),



(формула XXIX),



(формула XXX) и



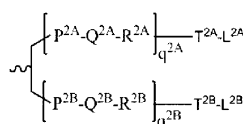
(формула XXXI),

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

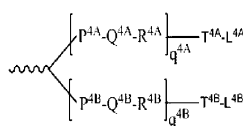
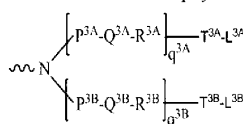
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

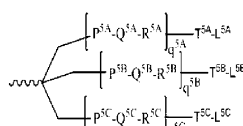
Формула XXXII



Формула XXXIII



Формула XXXIV



Формула XXXV

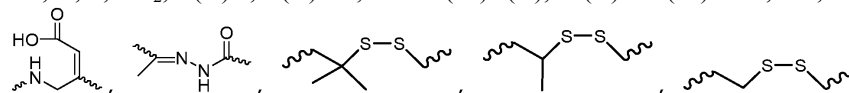
где

q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B и q5C равняются независимо в каждом случае 0-20, и где повторяющиеся звенья могут быть одинаковыми или различными;

каждый из R<sup>2A</sup>, R<sup>2B</sup>, R<sup>3A</sup>, R<sup>3B</sup>, R<sup>4A</sup>, R<sup>4B</sup>, R<sup>5A</sup>, R<sup>5B</sup>, R<sup>5C</sup>, T<sup>2A</sup>, T<sup>2B</sup>, T<sup>3A</sup>, T<sup>3B</sup>, T<sup>4A</sup>, T<sup>4B</sup>, T<sup>5A</sup>, T<sup>5B</sup>, T<sup>5C</sup> независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

Q<sup>2A</sup>, Q<sup>2B</sup>, Q<sup>3A</sup>, Q<sup>3B</sup>, Q<sup>4A</sup>, Q<sup>4B</sup>, Q<sup>5A</sup>, Q<sup>5B</sup>, Q<sup>5C</sup> независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

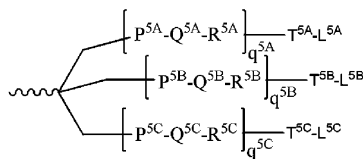
каждый из R<sup>2A</sup>, R<sup>2B</sup>, R<sup>3A</sup>, R<sup>3B</sup>, R<sup>4A</sup>, R<sup>4B</sup>, R<sup>5A</sup>, R<sup>5B</sup>, R<sup>5C</sup> независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O



или гетероцикл;

L<sup>2A</sup>, L<sup>2B</sup>, L<sup>3A</sup>, L<sup>3B</sup>, L<sup>4A</sup>, L<sup>4B</sup>, L<sup>5A</sup>, L<sup>5B</sup> и L<sup>5C</sup> представляют собой лиганд; т. е. каждый из них независимо для каждого случая представляет собой моносакхарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетра-сахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные линкеры, конъюгирующие производные GalNAc, особенно пригодны для применения со средствами для RNAi для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как характеризующиеся формулой (XXXVI)





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

|     |          |          |          |          |          |           |
|-----|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| NP№ | 4828979; | 4948882; | 5218105; | 5525465; | 5541313; | 5545730;  |
|     | 5552538; | 5578717; | 5580731; | 5591584; | 5109124; | 5118802;  |
|     | 5138045; | 5414077; | 5486603; | 5512439; | 5578718; | 5608046;  |
|     | 4587044; | 4605735; | 4667025; | 4762779; | 4789737; | 4824941;  |
|     | 4835263; | 4876335; | 4904582; | 4958013; | 5082830; | 5112963;  |
|     | 5214136; | 5245022; | 5254469; | 5258506; | 5262536; | 5272250;  |
|     | 5292873; | 5317098; | 5371241; | 5391723; | 5416203; | 5451463;  |
|     | 5510475; | 5512667; | 5514785; | 5565552; | 5567810; | 5574142;  |
|     | 5585481; | 5587371; | 5595726; | 5597696; | 5599923; | 5599928 и |
|     | 5688941; | 6294664; | 6320017; | 6576752; | 6783931; | 6900297;  |
|     | 7037646; | 8106022; |          |          |          |           |

Не обязательно, чтобы все положения в данном соединении были однотипно модифицированными, а в действительности несколько из вышеуказанных модификаций могут быть включены в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения на основе iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе iRNA, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т. е. нуклеотида, в случае соединения на основе dsRNA. Такие iRNA обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделить iRNA повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазами, повышенным клеточным захватом и/или повышенной аффинностью связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, значительно повышая тем самым эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, сравнимые результаты зачастую можно получить с более короткими iRNA при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфотиоатными дезокси-гибридизациями dsRNA того же целевого участка. Расщепление РНК-мишени обычно можно обнаружить с помощью гель-электрофореза и при необходимости с помощью методик гибридизации ассоциированных нуклеиновых кислот, известных в данной области.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с iRNA для усиления активности, распределения в клетке или клеточного поглощения iRNA, и процедуры для выполнения таких типов конъюгирования доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, имеют включенные липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтил-аммоний 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), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламиновый или гексиламинокарбонилостероидный

фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Иллюстративные патенты Соединенных Штатов, в которых изложена идея получения таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные схемы конъюгирования предусматривают синтез РНК, несущих аминоклипер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем вступает в реакцию с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего конденсирующего или активирующего реагентов. Реакцию конъюгирования можно выполнять с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК, в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

#### V. Доставка iRNA по настоящему изобретению

Доставку iRNA по настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, у которого имеется заболевание, нарушение или состояния, ассоциированное с TTR), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. В качестве альтернативы доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно обсуждаются ниже.

Обычно любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, то факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. Из результатов нескольких исследований виден эффективный нокдаун генных продуктов при локальном введении iRNA. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело яванских макаков (Tolentino, MJ., et al. (2004) Retina 24:132-138), так и путем субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216) предупреждают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам снижает объем опухолей (Pille, J., et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274) и может продлевать время жизни мышей с опухолями (Kim, WJ., et al. (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al. (2007) Mol. Ther. 15:515-523). Также было показано, что РНК-интерференция была успешной при локальной доставке в CNS (ЦНС) путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER., et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA., et al. (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, то РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать с помощью химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, направленную против AroB iRNA, конъюгированную с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, вводили системно мышам, что приводило к нокдауну mPHK AroB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al. (2004) Nature 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышиных моделях рака предстательной железы (McNamara, JO., et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связанными с iRNA, либо на них воздействуют с образованием везикул или мицеллы (см., например, Kim SH., et al. (2008) Journal of Controlled Release 129(2):107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование везикул или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при

системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, 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 включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al. (2003), выше; Verma, UN., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS., et al. (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипид (Chien, PY., et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME., et al. (2008) *Pharm. Res.* электронная публикация перед подачей в печать 16 августа; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA., et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции с iRNA и циклодекстринами можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки в полном его объеме.

А. Вектор, кодирующий iRNA по настоящему изобретению iRNA, нацеливающийся на ген TTR, может экспрессироваться единицами транскрипции, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно PCT № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно PCT № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от нескольких часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также может быть сконструирован с возможностью наследования его в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нить или нити iRNA могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования) для экспрессии двух отдельных нитей с получением, например, dsRNA. В альтернативном случае каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью так, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии iRNA, как правило, представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, которая описана в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как например: путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или с помощью любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в требуемую целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии iRNA в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектамином) или носителями на основе некаатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции с помощью липидов для iRNA-опосредованных нокдаунов, целенаправленно воздействующих на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или больше. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать с помощью разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить с помощью репортера, такого как флуоресцентный маркер, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена с применением маркеров, которые обеспечивают устойчивость трансфицированной клетки к определенным факторам окружающей среды (например, к антибиотикам и лекарственным средствам), как, например, устойчивость к гигромицину В.

Системы на основе вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (а) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвирус, например, поксвируса канареек или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не

будут встраиваться в геном клеток. При необходимости конструкции могут включать в себя последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д., для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, дополнительно описаны ниже.

Векторы, применимые для доставки iRNA, будут включать в себя регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии iRNA в требуемой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцируемой экспрессии.

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцируемой регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Такие индуцируемые экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование с помощью экидозона, с помощью эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогалактопиранозиды (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена iRNA.

Можно применять вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA.

Например, можно применять ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Данные ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* в гемопоэтические стволовые клетки для придания стволовым клеткам большей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993) и Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV (ВИЧ), описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Также для применения в доставке iRNA по настоящему изобретению предусматриваются аденовирусы. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные носители, например, для доставки генов в эпителий респираторного тракта. Аденовирусы естественным образом инфицируют эпителий респираторного тракта, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky и Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) было показано применение аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макаков-резусов. Дополнительные примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); публикации согласно PCT WO94/12649 и Wang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии iRNA, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно применять для доставки iRNA по настоящему изобретению (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных односторонних молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AAV-вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патент США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки iRNA по настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус коровьей оспы, например, аттенуированный вирус коровьей оспы, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипоксвирус, как, например, ос-

па кур или оспа канареек.

В случае необходимости тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами других вирусов или путем замещения различных вирусных капсидных белков. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно получать для нацеливания на различные клетки путем конструирования векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки.

Фармацевтический препарат на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе, или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. В качестве альтернативы в том случае, когда вектор доставки целого гена может продуцироваться нативно рекомбинантными клетками, например, ретровирусными векторами, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

#### VI. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают в себя iRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, применимы для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена TTR. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена TTR. В одном варианте осуществления средства на основе iRNA по настоящему изобретению, например, средство на основе dsRNA, составлены для подкожного введения в фармацевтически приемлемом носителе.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как например, в течение периода 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25 мин. Введение можно повторять, например, регулярно, как например: один раз в неделю, один раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. Введение можно повторять, например, ежемесячно или ежеквартально, например, приблизительно каждые 12 недель. По завершении схемы начального лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Например, после введения один раз в неделю или один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или iRNA можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при помощи непрерывной инфузии, или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае, количество iRNA, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить суммарную суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно применимы для доставки средств в определенный участок, например, их можно применять со средствами по настоящему изобретению. В данном варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее количество суточной дозы.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней, с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель или с интервалами не более 9, 10, 11 или 12 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления настоящего изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в месяц. В других вариантах осуществления разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят ежемесячно. В других вариантах осуществления разовую дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят ежеквартально.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эф-

фективным количеством композиции может предусматривать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных доз и периодов полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методологий или на основе тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другом месте в данном документе.

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

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

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать в себя трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Также могут быть применимы презервативы, перчатки с покрытием и т.п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают в себя нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтанолламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтанолламин DOTMA). iRNA, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C<sub>1-20</sub>алкильные эфиры (например, изопропилмиристит (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

#### A. Составы на основе iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли

iRNA для применения в композициях и способах по настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например, в липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе iRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе iRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы применимы для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, в случае введения липосом в ткань бислои липосомы сливаются с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает iRNA, доставляется в клетку, где iRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеливающими, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство на основе iRNA, можно получать с помощью ряда способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования мицелл из липидного компонента. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионогенным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препараты средства на основе iRNA затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством на основе iRNA и конденсируются вокруг средства на основе iRNA с образова-

нием липосомы. После конденсации моющее средство удаляют, например, путем диализа, с получением липосомного препарата со средством на основе iRNA.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять в ходе реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

Способы получения стабильных средств для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного липида в качестве структурных компонентов средств для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в Feigner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; в патенте США № 4897355; патент США № 5171678; Bangham et al. M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson, et al. Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim et al., Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; и Fukunaga, et al., Endocrinol. 115:757, 1984. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов с размером, соответствующим для использования в качестве средств для доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно использовать в тех случаях, когда требуются стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Такие способы легко адаптировать для упаковки препаратов средства на основе iRNA в липосомы.

Липосомы делятся на два больших класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильных комплексов. Положительно заряженный комплекс нуклеиновой кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие того, что внутри эндосомы кислый pH, липосомы разрываются, высвобождая их содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Чувствительные к pH липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции для нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции для анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипидов, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

Примеры других способов введения липосом в клетки *in vitro* и *in vivo* включают патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Feigner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; и Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-A в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионогенные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина A в различных слоях кожи (Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, термин, используемый в данном документе, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени полужизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть образующей везикулу липидной составляющей липосомы (A) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моно-

сиалоганглиозид  $G_{M1}$ , или (B) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, в данной области предполагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженной степени захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Papahadjopoulos et al. (Алл. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида  $G_{M1}$ , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen et al., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид  $G_{M1}$  или сложный эфир сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

В одном варианте осуществления применяют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств на основе iRNA к макрофагам.

Дополнительные преимущества липосом включают следующие: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; липосомы могут включать широкое разнообразие водо- и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные в их внутренних отделениях средства на основе iRNA от метаболизма и разрушения (Rosoff в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно применять для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке средства на основе iRNA (см., например, Feigner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 касательно описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно присоединяются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают такие соединения, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглицидиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPES") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помощью холестерина ("DC-Choi"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao X. and Huang L., Biochim. Biophys. Res. Commun. 179:280, 1991). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, характеризуются более низкой токсичностью и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты на основе катионных липидов



включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы особенно подходят для местного введения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные действия по отношению к высокой системной абсорбции вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в необходимой мишени и возможность введения средства на основе iRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства на основе iRNA к эпидермальным клеткам, а также для усиления проникновения средства на основе iRNA в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно вводить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу

(см., например,

Weiner et al., et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. et al. *Gene* 56:267-276. 1987; Nicolau, C. et al. *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. and Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Для доставки лекарственного средства в дерму кожи мышей использовали неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир). Такие составы со средством на основе iRNA применимы для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая способность к деформации может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, типом способных к деформации липосом являются трансферосомы. Трансферосомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы, которые включают средство на основе iRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства на основе iRNA к кератиноцитам кожи. Для того, чтобы пройти сквозь неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливаться к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, подходящие для реализации настоящего изобретения, описаны в публикации согласно РСТ № WO 2008/042973, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Трансферосомы представляют собой еще один тип липосом и являются высокодеформируемыми липидными агрегатами, которые являются перспективными кандидатами как средства для доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферосомы являются приспособляемыми к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливаются к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают своих мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферосом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы применяли для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферосомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распре-

деления по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их применяют при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицероловые эфиры, сложные полиглицероловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, как например: этоксилаты жирных спиртов, пропоксиллированные спирты и этоксилированные/пропоксиллированные блок-сополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как например: омыляющие вещества, ацил-лактаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты, и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее используемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести и положительный, и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Для применения в способах по настоящему изобретению iRNA может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярной сборки, в которой амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры так, что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой.

Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе siRNA, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланит-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкильные эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию на основе siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами.

Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешан-

ной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного распыляемого раствора.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены путем проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто требуется увеличить, например по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

#### В. Липидные частицы

iRNA, например dsRNA, по настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например, в LNP или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. Как правило, LNP содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP исключительно пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от участка введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который изложен в публикации согласно PCT № WO 00/03683. Средний диаметр частиц по настоящему изобретению обычно составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и они являются практически нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и публикации согласно PCT № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение вес/вес) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-диолеиленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-диолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-диолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-диолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-диолеилоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-диолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-диолеилоил-2-диолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлористую соль 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-диолеилоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-диолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-диолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-диолеиленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-диолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]-диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-диолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц на основе липида-siRNA. Синтез 2,2-диолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США

номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

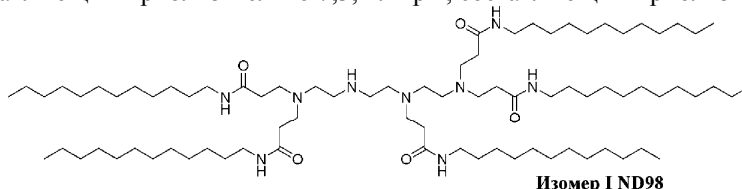
В одном варианте осуществления частица на основе липида-siRNA включает 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% PEG-C-DOMG (молярный процент) с размером частиц, составляющим  $63,0 \pm 20$  нм, и соотношением siRNA/липид, составляющим 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе без ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоил-фосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароил-фосфатидил-этанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Содержание некатионного липида может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 90 мол.%, приблизительно 10 или приблизительно 58 мол.%, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который препятствует агрегации частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе без ограничения PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил ( $C_{12}$ ), PEG-димиристоилоксипропил ( $C_{14}$ ), PEG-дипальмитилоксипропил ( $C_{16}$ ) или PEG-дистеарилоксипропил ( $C_{18}$ ). Содержание конъюгированного липида, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 до приблизительно 20 мол.% или приблизительно 2 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица на основе нуклеиновой кислоты-липид дополнительно включает холестерин в количестве, составляющем, например, от приблизительно 10 до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления липидоид ND98-4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастиц на основе липида-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы в этаноле каждого из них могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например при молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы на основе липида-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечением по размеру в 100 нм) с использованием, например, экструдера с термоцилиндром, как например Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, с помощью диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) со значением pH, составляющим приблизительно 7, например pH, составляющим приблизительно 6,9, pH, составляющим приблизительно 7,0, pH, составляющим приблизительно 7,1, pH, составляющим приблизительно 7,2, pH, составляющим приблизительно 7,3, или pH, составляющим приблизительно 7,4.



Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липида-dsRNA описаны в табл. 1.

Таблица А

|         | Ионизируемый/ катионный липид                                                                                                         | Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид<br>Соотношение липид:siRNA |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| SNALP-1 | 1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)                                                                                  | DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA<br>(57,1/7,1/34,4/1,4)<br>Липид:siRNA ~ 7:1               |
| 2-XTC   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA<br>57,1/7,1/34,4/1,4<br>Липид:siRNA ~ 7:1                     |
| LNP05   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>57,5/7,5/31,5/3,5<br>Липид:siRNA ~ 6:1                      |
| LNP06   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>57,5/7,5/31,5/3,5<br>Липид:siRNA ~ 11:1                     |
| LNP07   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>60/7,5/31/1,5<br>Липид:siRNA ~ 6:1                          |
| LNP08   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>60/7,5/31/1,5<br>Липид:siRNA ~ 11:1                         |
| LNP09   | 2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)                                                                               | XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA 10:1                          |
| LNP10   | (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)                | ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA 10:1                       |
| LNP11   | (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)                                                 | MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA 10:1                         |
| LNP12   | 1,1'-(2-(4-(2-(2-(Бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) | Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA 10:1                      |
| LNP13   | XTC                                                                                                                                   | XTC/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 33:1                            |
| LNP14   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>40/15/40/5<br>Липид:siRNA: 11:1                                |
| LNP15   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG<br>50/10/35/4,5/0,5<br>Липид:siRNA: 11:1           |
| LNP16   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 7:1                             |
| LNP17   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 10:1                            |
| LNP18   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 12:1                            |
| LNP19   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DMG<br>50/10/35/5<br>Липид:siRNA: 8:1                                 |
| LNP20   | MC3                                                                                                                                   | MC3/DSPC/холест./PEG-DPG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 10:1                            |
| LNP21   | C12-200                                                                                                                               | C12-200/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 7:1                         |
| LNP22   | XTC                                                                                                                                   | XTC/DSPC/холест./PEG-DSG<br>50/10/38,5/1,5<br>Липид:siRNA: 10:1                            |

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средн. мол. массой 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средн. мол. массой 2000);

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-!,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со средн. мол. массой 2000).

Составы, содержащие SNALP (1,2-дифенилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие XTC, описаны в публикации согласно РСТ № WO 2010/088537, полное содержание которой включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны в публикации согласно РСТ № WO 2010/054406, полное содержание которой включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в публикации согласно РСТ № WO 2010/129709, полное содержание которой включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или минитаблетки. Могут потребоваться загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. Описанные в настоящем изобретении dsRNA могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе частиц, высушенных распылением, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинотетраэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального введения для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, в публикации патента США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интраклеточного, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как без ограничения вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, которые включают без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. В частности, предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам,

хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию приведения активных ингредиентов во взаимодействие с фармацевтическим(фармацевтическими) носителем(носителями) или наполнителем(наполнителями). Обычно составы получают путем равномерного и тщательного приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или и первыми, и вторыми, а затем при необходимости придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в какой-либо из многих возможных лекарственных форм, как например, без ограничения таблеток, капсул, желатиновых капсул, жидких сиропов, мягких гелей, суппозиториях и клизм. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

#### С. Дополнительные составы

##### i) Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм

(см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al. в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301).

Эмульсии зачастую представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является тонкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы в тех случаях, когда масляная фаза является тонкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе, либо собственно в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как например в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию по типу o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической стабильностью либо ее отсутствием. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме с помощью эмульгаторов или за счет вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсий мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть разделены на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные базы и тонкодисперсные твердые вещества

(см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

**Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и они рассмотрены в литературе**

(см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199).

Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества могут быть разделены на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные

(см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу w/o, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или тристеарат глицерина.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в эмульсионные составы, и они обуславливают определенные свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты

(Block, 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).

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



Поскольку эмульсии зачастую содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микроорганизмов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют в эмульсионные составы для предупреждения ухудшения качества состава. Используемые антиоксиданты могут быть акцепторами свободных радикалов, как например: токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения 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, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Эмульсионные составы для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с позиции эффективности при абсорбции и биодоступности (см., например,

Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms и Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся в числе материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу o/w.

#### ii) Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически устойчивым жидким раствором

(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).

Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают сперва путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются 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, pages 185-215).

Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит.

Является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985,

р. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии

(см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335).

По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии имеют преимущество солюбилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокаприлат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секиволеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без использования вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать в себя без ограничения такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как по типу o/w, так и по типу w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенной клинической действенности и пониженной токсичности (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть в особенности преимущественным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными в трансдермальной доставке активных компонентов как в применениях в косметологии, так и в фармации. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное клеточное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут классифицироваться, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, отличные от поверхностно-активных веществ (Lee et al., Critical

Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

### iii) Микрочастицы

Средство на основе iRNA по настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

### iv) Вещества, способствующие проникновению

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, отличные от поверхностно-активных веществ

(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 веществ, способствующих проникновению, описан более подробно ниже.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и простой полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир

(см., например, Malmsten, M.

Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92) и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, dicaпрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C<sub>1-20</sub>алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миристанат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.)

(см.

например, Touitou, E., et al. Enhancement в Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews в Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и всасывании липидов и жирорастворимых витаминов

(см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935).

Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауредезоксихолевую кислоту (тауредезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и простой полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE)

(см.,

например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую оболочку. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и таким образом ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения двунатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонных (енамины)

(см.,

например, Katdare, A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

Как используется в данном документе, нехелатирующие соединения, отличные от поверхностно-активных веществ, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевинны, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно PCT WO 97/30731), также, как

известно, усиливают поглощение dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), iRNAMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VascuPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США).

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

#### v) Носители

Определенные композиции по настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Используемый в данном документе термин "соединение-носитель" или "носитель" может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемого в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение частично фосфотиоатной dsRNA тканью печени может быть сокращено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетида-4'-изотиоцианостильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

#### vi) Наполнители

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

Также для составления композиций по настоящему изобретению можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые раство-

ры, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, в таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

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

#### vii) Другие компоненты

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

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают: (а) одно или несколько соединений на основе iRNA и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от iRNA, и которые применимы в лечении гемолитического нарушения. Примеры таких средств включают без ограничения противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза.

Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с iRNA, описанными в данном документе. Другие средства, применимые для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217, Tung et al., и в публикации заявки на патент США № 2004/0127488, Hale et al.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз для токсических и терапевтических эффектов представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах с клеточными культурами и в исследованиях на животных, можно использовать при подборе диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED<sub>50</sub> с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемых лекарственной формы и пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов с клеточными культурами. Доза может быть составлена для животных моделей с целью получения диапазона циркулирующей концентрации в плазме крови соединения или при необходимости полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию исследуемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную на клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения применимых у людей доз. Уровни в плазме крови можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждаемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении,

можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией TTR. В любом случае курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств для измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

#### VII. Способы ингибирования экспрессии TTR

В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии транстиретина (TTR) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии TTR в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии TTR в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. Также возможны комбинации способов приведения клетки или группы клеток в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение клетки или группы клеток в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как обсуждалось выше. Более того, приведение клетки или группы клеток в контакт можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc<sub>3</sub> или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "подавлением", "супрессией" и другими подобными терминами, и он включает любой уровень ингибирования. Предпочтительно ингибирование включает статистически значимое или клинически значимое ингибирование.

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии TTR" означает ингибирование экспрессии любого гена TTR (такого как, например, ген TTR мыши, ген TTR крысы, ген TTR обезьяны или ген TTR человека), а также вариантов или мутантов гена TTR. Таким образом, ген TTR может представлять собой ген TTR дикого типа, мутантный ген TTR (такой как мутантный ген TTR, который является причиной отложения амилоида) или трансгенный ген TTR в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутого генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена TTR" включает любой уровень ингибирования гена TTR, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена TTR. Экспрессию гена TTR можно оценивать исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена TTR, например, уровня мРНК TTR, уровня белка TTR или количества или степени отложений амилоида. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией TTR, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в данной области, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена TTR ингибируется по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99% или до уровня, который является ниже уровня обнаружения в анализе. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена TTR приводит к нормализации уровня гена TTR, так что разница между уровнем перед лечением и нормальным уровнем контроля снижается по меньшей мере на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование является клинически значимым ингибированием.

Доказательством ингибирования экспрессии гена TTR может служить снижение количества мРНК,

экспрессируемого первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген TTR и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена TTR ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(контрольные) клетка(клетки)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

Альтернативно, ингибирование экспрессии гена TTR можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена TTR, например, экспрессии белка TTR, уровня ретинолсвязывающего белка, уровня витамина А или наличие отложений амилоида, содержащих TTR. Сайленсинг гена TTR можно выявить в любой клетке, экспрессирующей TTR либо конститутивно, либо с помощью генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного из уровня техники. Печень является основным местом экспрессии TTR. Другие важные места экспрессии включают сосудистое сплетение, сетчатку и поджелудочную железу.

Доказательством ингибирования экспрессии белка TTR может служить снижение уровня белка TTR, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки подавления экспрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которую(которые) можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена TTR, включают клетку или группу клеток, которая(которые) еще не были приведены в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК TTR, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей мРНК TTR можно определять с применением любого способа, известного из уровня техники, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии TTR в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена TTR. РНК можно извлекать из клеток с помощью методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и анализы с использованием микрочипов. Циркулирующую мРНК TTR можно выявить с помощью способов, описанных в PCT/US 2012/043584, полное содержание которой тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии TTR определяют с использованием зонда для нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретным TTR. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Специально можно сконструировать зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения блоттинг по Саузерну или нозерн-блот-анализы, анализы на основе полимеразной цепной реакции (PCR) и анализы с применением матриц с зондами. Один способ определения уровней мРНК предусматривает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК TTR. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем разделения выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, например, нитроцеллюлозную. В альтернативном варианте осуществления зонд(зонды) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(зондами), например на матрице GeneChip от Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровня мРНК TTR.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии TTR в образце предусматривает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например, мРНК в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в



Mullis, 1987, патенте США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), репликазы Q-бета (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты с последующим обнаружением амплифицированных молекул с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области. Такие схемы выявления особенно применимы для выявления молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии TTR определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™).

Уровни экспрессии мРНК TTR можно контролировать с помощью мембранного блота (как, например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, Саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии TTR также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с применением анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе.

Уровень экспрессии белка TTR можно определить, используя любой способ, известный из уровня техники для измерения уровней белка. Такие способы предусматривают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и им подобные.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению можно контролировать путем обнаружения или отслеживания уменьшения отложения TTR-амилоида. Выражение уменьшение отложения TTR-амилоида, используемое в данном документе, включает любое уменьшение размера, количества или тяжести отложений TTR, или предотвращение или уменьшение образования отложений TTR в пределах органа или области организма субъекта, как можно оценить *in vitro* или *in vivo* любым способом, известным из уровня техники. Например, некоторые способы оценки отложений амилоида описаны в Gertz, M.A. & Rajukumar, S.V. (Editors) (2010), *Amyloidosis: Diagnosis and Treatment*, New York: Humana Press. Способы оценки отложений амилоида могут включать биохимические анализы, а также визуальную или компьютерную оценку отложений амилоида, которые становятся видимыми, например, с помощью иммуногистохимического окрашивания, флуоресцентной метки, световой микроскопии, электронной микроскопии, флуоресцентной микроскопии или других типов микроскопии. Для оценки отложений амилоида можно использовать инвазивные или неинвазивные способы визуализации, в том числе, например, CT, PET или NMR/MRI-визуализацию.

Способы по настоящему изобретению могут обеспечивать уменьшение отложений TTR в любом из ряда тканей или областей организма, в том числе без ограничения сердце, печени, селезенке, пищеводе, желудке, кишечнике (подвздошной кишке, двенадцатиперстной кишке и толстой кишке), головном мозге, седалищном нерве, спинномозговом ганглии, почке и сетчатке.

Термин "образец", используемый в данном документе, относится к отбору схожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и им подобные. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или из определенных сегментов печени, или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты), сетчатки или части сетчатки (например, пигментного эпителия сетчатки), центральной нервной системы или частей центральной нервной системы (например, желудочков или хороидного сплетения) или поджелудочной железы или определенных клеток или частей поджелудочной железы. В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь, взятую у субъекта, или плазму крови, полученную из нее. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" относится к ткани печени или ткани сетчатки, полученных от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному участку в организме субъекта. Ингибирование экспрессии TTR можно оценивать с помощью измерений уровня или изменения уровня

мРНК TTR или белка TTR в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления место выбрано из группы, состоящей из печени, хоройдного сплетения, сетчатки и поджелудочной железы. Место также может представлять собой группу или подгруппу клеток из любого из указанных выше мест (например, гепатоциты или пигментный эпителий сетчатки). Место также может включать клетки, которые экспрессируют определенный тип рецептора (например, гепатоциты, которые экспрессируют асиалогликопротеиновый рецептор).

#### VIII. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с TTR заболевания

В настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения или предупреждения ассоциированного с TTR заболевания у субъекта. Способы предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества средства для RNAi по настоящему изобретению.

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, в том числе примата (такого как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), отличного от примата млекопитающего (такого как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомячок, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся). Субъект может предусматривать трансгенный организм.

В варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, подвергаемый лечению или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена TTR; человек, подверженный риску развития заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена TTR; человек, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена TTR; и/или человек, подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена TTR, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект страдает ассоциированным с TTR заболеванием. В других вариантах осуществления субъектом является субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания, например, субъект с мутацией гена TTR, ассоциированной с развитием ассоциированного с TTR заболевания (например, до появления признаков или симптомов, указывающих на развитие TTR-амилоидоза), субъект, в семейном анамнезе которого имеется случай ассоциированного с TTR заболевания (например, до появления признаков или симптомов, указывающих на развитие TTR-амилоидоза), или субъект, у которого имеются признаки или симптомы, указывающие на развитие TTR-амилоидоза.

Как используется в данном документе, "ассоциированное с TTR заболевание" включает любое заболевание, вызванное или ассоциированное с образованием отложений амилоида, в которых предшественники фибрилл состоят из варианта белка TTR или белка TTR дикого типа. Мутантный TTR и TTR дикого типа приводит к различным формам отложений амилоида (амилоидоза). Амилоидоз предусматривает образование и агрегацию неправильно свернутых белков, в результате чего формируются внеклеточные отложения, которые нарушают функцию органа. Клинические синдромы, ассоциированные с агрегацией TTR, включают, например, старческий системный амилоидоз (SSA); системный семейный амилоидоз; семейную амилоидотическую полинейропатию (FAP); семейную амилоидотическую кардиомиопатию (FAC) и лептоменингеальный амилоидоз, также известный как лептоменингеальный или менингоцереброваскулярный амилоидоз, амилоидоз центральной нервной системы (ЦНС) или амилоидоз VII формы.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим семейной амилоидотической кардиомиопатией (FAC). В другом варианте осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим FAC со смешанным фенотипом, т.е. субъекту, у которого имеются как нарушения сердечной деятельности, так и неврологические нарушения. В еще одном варианте осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим FAP со смешанным фенотипом, т.е. субъекту, у которого имеются как неврологические нарушения, так и нарушения сердечной деятельности. В одном варианте осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим FAP, которую лечили путем ортотопической трансплантации печени (OLT). В другом варианте осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим старческим системным амилоидозом (SSA). В других вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим семейной амилоидотической кардиомиопатией (FAC) и старческим системным амилоидозом (SSA). TTR с нормальной последовательностью вызывает амилоидоз сердца у людей пожилого возраста и называется старческим системным амилоидозом (SSA) (также называемый старческим амилоидозом сердца (SCA) или амилоидозом сердца). SSA часто сопровождается микроскопическими отложениями во многих других органах. Мутации TTR обуславливают ускорение процесса образования TTR-амилоида и являются наиболее важным фактором риска развития клинически значимого TTR-амилоидоза (также называемого ATTR (амилоидоз транстиретинового типа)). Известно, что более 85 амилоидогенных вариантов TTR вызывают системный семейный амилоидоз.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средства для RNAi по настоящему изобретению вводят субъектам, страдающим связанной с транстиретином (TTR) семейной амилоидотической полинейропатией (FAP). Такие субъекты могут страдать от офтальмологических проявлений, таких как помутнение стекловидного тела и глаукома. Специалисту в данной области известно, что амилоидогенный транстиретин (ATTR), синтезируемый пигментным эпителием сетчатки (RPE), играет важные роли в прогрессировании амилоидоза глаза. Предыдущие исследования показали, что панретинальная лазерная фотокоагуляция, с помощью которой снижали количество клеток RPE, предотвращала прогрессирование отложения амилоида в стекловидном теле, указывая на то, что эффективное подавление экспрессии ATTR в RPE может стать новой терапией амилоидоза глаза (см., например, Kawaji, T., et al., *Ophthalmology*. (2010) 117: 552-555). Способы по настоящему изобретению применимы для лечения офтальмологических проявлений FAP, связанной с TTR, например, амилоидоза глаза. Средство для RNAi можно доставлять способом, подходящим для нацеливания на конкретную ткань, такую как глаз. Способы глазной доставки включают ретробульбарную инъекцию, инъекцию под кожу века, субконъюнктивальную, субтеноновую инъекцию, инъекцию в переднюю камеру глаза или интравитреальную инъекцию (или внутреннюю инъекцию или инфузию). Конкретные составы для глазной доставки включают глазные капли или мази.

Другим ассоциированным с TTR заболеванием является гипертироксинемия, также известная как "дистрантиретиновая гипертироксинемия" или "диспреальбуминемическая гипертироксинемия". Этот тип гипертироксинемии может быть вызван повышенным связыванием тироксина с TTR из-за того, что мутантная молекула TTR имеет повышенную аффинность к тироксину. См., например, Moses et al. (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033.

Средства для RNAi по настоящему изобретению можно вводить субъекту с помощью любого способа введения, известного из уровня техники, в том числе без ограничения подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций.

В предпочтительных вариантах осуществления средства вводят субъекту подкожно. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят разовую дозу средства для RNAi посредством подкожной инъекции, например, инъекции в брюшную полость, в бедро или в плечо. В других вариантах осуществления субъекту вводят разделенную дозу средства для RNAi посредством подкожной инъекции. В одном варианте осуществления разделенную дозу средства для RNAi вводят субъекту посредством подкожной инъекции в два разных анатомических места расположения в организме субъекта. Например, субъекту могут осуществлять подкожную инъекцию разделенной дозы, составляющей приблизительно 250 мг (например, приблизительно половину дозы 500 мг), в правую руку и приблизительно 250 мг в левую руку. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения подкожное введение представляет собой самостоятельное введение с помощью, например, предварительно заполненного шприца или автоматического медицинского шприца. В некоторых вариантах осуществления доза средства для RNAi для подкожного введения содержится в объеме, составляющем один мл или меньше, например, фармацевтически приемлемого носителя.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. Инъекция депо-препарата может высвобождать средство для RNAi устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, путем инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для получения требуемого эффекта, например, требуемого ингибирования экспрессии TTR или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата представляет собой подкожную инъекцию.

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

В вариантах осуществления, в которых средство для RNAi вводят посредством насоса для подкожных инфузий, разовую дозу средства для RNAi можно вводить субъекту в течение периода времени, составляющего от приблизительно 45 до приблизительно 5 мин, например, приблизительно 45 мин, приблизительно 40 мин, приблизительно 35 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 25 мин, приблизительно 20 мин, приблизительно 15 мин, приблизительно 10 мин или приблизительно 5 мин.

Другие способы введения включают эпидуральное, внутричерепное, интрацеребровентрикулярное, назальное введение, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрикостную инфузию, подоболоечное, и интравитреальное, и легочное. Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо ли

местное или системное лечение, и исходя из области, подлежащей лечению. Путь и место введения можно выбрать для усиления целенаправленного воздействия.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят субъекту в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии TTR в клетке в организме субъекта. Количество, эффективное для ингибирования экспрессии TTR в клетке в организме субъекта, можно оценивать с помощью способов, обсуждаемых выше, в том числе способов, которые предусматривают осуществление оценки ингибирования экспрессии мРНК TTR, белка TTR или связанных переменных, таких как отложения амилоида.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят субъекту в терапевтически или профилактически эффективном количестве.

"Терапевтически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого, при введении пациенту для лечения ассоциированного с TTR заболевания, достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения интенсивности, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести, а также анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией TTR, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

"Профилактически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого, при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы ассоциированного с TTR заболевания, но у которого может иметься предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Симптомы, которые можно ослабить, включают сенсорную нейропатию (например, парестезию, гипестезию в дистальных отделах конечностей), вегетативную нейропатию (например, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, такое как язва желудка, или ортостатическая гипотензия), моторную нейропатию, судороги, деменцию, миелопатию, полинейропатию, синдром запястного канала, вегетативную недостаточность, кардиомиопатию, помутнение стекловидного тела, почечную недостаточность, нефропатию, существенно уменьшенный mBMI (модифицированный индекс массы тела), нарушение функции черепно-мозговых нервов и решетчатую дегенерацию роговицы. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, развивающегося позже. "Профилактически эффективное количество" может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания, а также анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый требуемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, используемые в способах по настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для достижения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Используемые в данном документе фразы "терапевтически эффективное количество" и "профилактически эффективное количество" также включают количество, которое обеспечивает благоприятный эффект при лечении, предупреждении или контроле патологических процессов или симптома(симптомов) патологических процессов, опосредованных экспрессией TTR. Симптомы TTR-амилоидоза включают сенсорную нейропатию (например, парестезию, гипестезию в дистальных отделах конечностей), вегетативную нейропатию (например, нарушение функции желудочно-кишечного тракта, такое как язва желудка, или ортостатическая гипотензия), моторную нейропатию, судороги, деменцию, миелопатию, полинейропатию, синдром запястного канала, вегетативную недостаточность, кардиомиопатию, помутнение стекловидного тела, почечную недостаточность, нефропатию, существенно уменьшенный mBMI (модифицированный индекс массы тела), нарушение функции черепно-мозговых нервов и решетчатую дегенерацию роговицы.

В одном варианте осуществления, например, если у субъекта имеется FAP, FAP со смешанным фенотипом, FAS со смешанным фенотипом или FAP, и у него проводили OLT, лечение субъекта с помощью средства на основе dsRNA по настоящему изобретению замедляет прогрессирование нейропатии. В другом варианте осуществления, например, если у субъекта имеется FAP, FAP со смешанным фенотипом, FAS со смешанным фенотипом, SSA или FAP, и у него проводили OLT, лечение субъекта с помощью средства на основе dsRNA по настоящему изобретению замедляет прогрессирование нейропатии и кардиомиопатии.

Например, в одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают замедление, снижение или прекращение развития неврологического нарушения. Любую подходящую систему измерений неврологического нарушения можно использовать для определения того, произошло

ли у субъекта снижение, замедление или прекращение развития неврологического нарушения.

Одной из подходящих систем измерений является шкала оценки невропатических нарушений (NIS). NIS относится к бальной системе, с помощью которой измеряют слабость, чувственное восприятие и рефлексы, особенно в отношении периферической нейропатии. В баллах по шкале NIS оценивают стандартную группу мышц на слабость (1 означает 25% слабость, 2 означает 50% слабость, 3 означает 75% слабость, 3,25 означает движение против силы тяжести, 3,5 означает движение при устранении силы тяжести, 3,75 означает дрожание мышц без движения и 4 означает паралич), стандартную группу мышц на рефлексы при растяжении (0 означает нормальные, 1 означает уменьшенные, 2 означает отсутствующие), а также чувства прикосновения и давления, вибрации, положение и движения суставов и укола булавкой (все из которых оценивают на указательном пальце и большом пальце ноги: 0 означает нормальные, 1 означает уменьшенные, 2 означает отсутствующие). Оценки корректируют по возрасту, полу и физической подготовке.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают снижение балла по шкале NIS по меньшей мере на 10%. В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению приводят к снижению балла по шкале NIS по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или по меньшей мере на 50%. В других вариантах осуществления способы обеспечивают прекращение повышения балла по шкале NIS, например, способ приводит к 0% повышению балла по шкале NIS. В еще нескольких других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают замедление скорости повышения балла по шкале NIS, например, скорости повышения балла по шкале NIS у субъекта, получавшего лечение средством для RNAi по настоящему изобретению, по сравнению со скоростью повышения балла по шкале NIS у субъекта, который не получал лечение средством для RNAi по настоящему изобретению.

Способы определения балла по шкале NIS у субъекта-человека хорошо известны специалисту в данной области, и их можно найти, например, в Dyck, PJ et al. (1997) *Neurology* 1997. 49(1): pp. 229-239; Dyck, PJ. (1988) *Muscle Nerve*. Jan; 11(1):21-32.

Другой подходящей системой измерений неврологического нарушения является модифицированная шкала оценки невропатических нарушений (mNIS+7). Как известно рядовому специалисту в данной области, mNIS+7 относится к оценке неврологического нарушения (NIS) на основе клинического обследования в сочетании с электрофизиологическими измерениями функции малых и больших нервных волокон (NCS и QST) и измерением вегетативных функций (постуральных изменений кровяного давления). Шкала mNIS+7 является модификацией шкалы NIS+7 (которая представляет собой NIS плюс семь тестов). По шкале NIS+7 анализируют слабость и рефлексы мышц на растяжение. Пять из семи тестов учитывают характеристики проводимости нервов. Эти характеристики представляют собой амплитуду сложного потенциала действия мышцы, возникающего во время раздражения перонеального нерва, скорость проведения импульса по двигательному нерву и дистальную латентность двигательного нерва (MNDL), MNDL большеберцового нерва и амплитуды потенциалов действия чувствительного икроножного нерва. Эти значения корректируют с учетом переменных возраста, пола, роста и веса. Остальные два из семи тестов включают порог вибрационной чувствительности и снижение частоты сердечных сокращений при глубоком дыхании.

Шкала mNIS+7 является модификацией NIS+7, которая учитывает применение гибкого количественного сенсорного тестирования по соматотопическому принципу, новых оценок вегетативных функций и применение амплитуд сложных потенциалов действия мышц, которые возникают во время раздражения локтевого, перонеального и большеберцового нервов, а также потенциалов действия чувствительных нервов для локтевого и икроножного нервов (Suanprasert, N. et al. (2014) *J. Neurol. Sci.*, 344(1-2): pp. 121-128).

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают снижение балла по шкале mNIS+7 по меньшей мере на 10%. В других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению приводят к снижению балла по шкале mNIS+7 по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 или по меньшей мере на 50%. В других вариантах осуществления способы обеспечивают прекращение повышения балла по шкале mNIS+7, например, способ приводит к 0% повышению балла по шкале mNIS+7. В еще нескольких других вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают замедление скорости повышения балла по шкале NIS+7, например, скорости повышения балла по шкале NIS+7 у субъекта, получавшего лечение средством для RNAi по настоящему изобретению, по сравнению со скоростью повышения балла по шкале NIS+7 у субъекта, который не получал лечение средством для RNAi по настоящему изобретению.

С помощью терапевтических и профилактических способов по настоящему изобретению также можно улучшать другие клинические параметры, такие как способность к ходьбе, у субъекта, подвергнутого лечению. Например, во время или после периода лечения у субъекта может наблюдаться увеличенная способность к физической нагрузке или активность.

Любую подходящую систему измерений способности к физической нагрузке можно применять для определения того, имеет ли субъект повышенную способность к физической нагрузке или активность. Одной подходящей системой измерения является тест 6-минутной ходьбы (6MWT), в котором измеряют

то, как далеко может пройти субъект за 6 мин, т.е. пройденное расстояние за 6 минут (6MWD). В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают для субъекта увеличение 6MWD от исходного уровня до значения, соответствующего по меньшей мере приблизительно 10 мин, например, приблизительно 10, 15, 20 или приблизительно 30 мин.

Терапевтически эффективное количество и профилактически эффективное количество средства для RNAi по настоящему изобретению также включает количество, которое улучшает один или несколько параметров качества жизни по сравнению с исходным уровнем, например, обеспечивает увеличение балла по меньшей мере по одной из функциональных шкал опросника оценки состояния здоровья SF-36®; и/или увеличение продолжительности жизни; и/или снижение частоты госпитализаций.

Можно применять любую подходящую систему измерения качества жизни. Например, в опроснике оценки состояния здоровья SF-36® представлена самостоятельно заполняемая многопунктовая шкала, по которой измеряют восемь параметров здоровья: физическое функционирование, ролевые ограничения, обусловленные проблемами физического здоровья, интенсивность боли, общее состояние здоровья, жизненная активность (энергичность и утомляемость), социальное функционирование, ролевые ограничения, обусловленные эмоциональными проблемами, и психологическое здоровье (психологическое недомогание и психологическое благополучие). В опроснике также представлен обобщенный физический компонент и обобщенный психологический компонент. В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают для субъекта улучшение по меньшей мере одного из параметров SF-36, связанных с физическим здоровьем (физическое здоровье, ролевое функционирование, обусловленное физическим состоянием, интенсивность боли и/или общее состояние здоровья), и/или по меньшей мере одного из параметров SF-36, связанных с психологическим здоровьем (жизненная активность, социальное функционирование, ролевое функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием, и/или психологическое здоровье), по сравнению с исходным уровнем. Такое улучшение может выражаться в увеличении любого одного или нескольких параметров по меньшей мере на 1 единицу шкалы, например, по меньшей мере на 2 или по меньшей мере на 3 единицы.

С помощью способов по настоящему изобретению также можно улучшить прогноз для субъекта, подвергаемого лечению. Например, способы по настоящему изобретению могут обеспечивать для субъекта снижение вероятности наступления события клинического ухудшения в течение периода лечения.

Доза средства для RNAi, которую вводят субъекту, может быть подобрана с уравниванием риска и пользы определенной дозы, например, для достижения требуемого уровня подавления экспрессии гена TTR (который определяют, например, исходя из подавления экспрессии мРНК TTR, экспрессии белка TTR или снижения отложения амилоида, как определено выше) или требуемого терапевтического или профилактического эффекта, вместе с тем одновременно избегая нежелательных побочных эффектов.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению вводят субъекту в виде дозы по весу. "Доза по весу" (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу средства на основе iRNA, которая будет изменяться в зависимости от веса субъекта. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA вводят субъекту в виде фиксированной дозы. "Фиксированная доза" (например, доза в мг) означает, что для всех субъектов применяют одну дозу средства на основе iRNA независимо от любых конкретных связанных с субъектом факторов, таких как вес. В одном конкретном варианте осуществления фиксированная доза средства на основе iRNA по настоящему изобретению основана на предварительно определенном весе или возрасте.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, приблизительно

0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,55 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,65 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,75 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,95 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг dsRNA, 6,9 мг/кг dsRNA, 7,0 мг/кг dsRNA, 7,1 мг/кг dsRNA, 7,2 мг/кг dsRNA, 7,3 мг/кг dsRNA, 7,4 мг/кг dsRNA, 7,5 мг/кг dsRNA, 7,6 мг/кг dsRNA, 7,7 мг/кг dsRNA, 7,8 мг/кг dsRNA, 7,9 мг/кг dsRNA, 8,0 мг/кг dsRNA, 8,1 мг/кг dsRNA, 8,2 мг/кг dsRNA, 8,3 мг/кг dsRNA, 8,4 мг/кг dsRNA, 8,5 мг/кг dsRNA, 8,6 мг/кг dsRNA, 8,7 мг/кг dsRNA, 8,8 мг/кг dsRNA, 8,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 9,1 мг/кг dsRNA, 9,2 мг/кг dsRNA, 9,3 мг/кг dsRNA, 9,4 мг/кг dsRNA, 9,5 мг/кг dsRNA, 9,6 мг/кг dsRNA, 9,7 мг/кг dsRNA, 9,8 мг/кг dsRNA, 9,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 10 мг/кг dsRNA, 15 мг/кг dsRNA, 20 мг/кг dsRNA, 25 мг/кг dsRNA, 30 мг/кг dsRNA, 35 мг/кг dsRNA, 40 мг/кг dsRNA, 45 мг/кг dsRNA или приблизительно 50 мг/кг dsRNA.

Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, где композиция по настоящему изобретению содержит описанную в данном документе dsRNA и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8 до приблизительно 10

мг/кг, от приблизительно 8,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 9 до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 9,5 до приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей приблизительно

0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,  
1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3,  
2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6,  
3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9,  
5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2,  
6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5,  
7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8,  
8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9

или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления, например, где композиция по настоящему изобретению содержит описанную в данном документе dsRNA и N-ацетилгалактозамин, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, от приблизительно 0,01 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,15 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,6 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,25 до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8,5 до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 9 до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 9,5 до приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

Например, dsRNA можно вводить в дозе, составляющей приблизительно

0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8,  
0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,  
2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3,  
3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6,  
4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9,  
6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2,  
7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5,  
8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8,  
9,9

или приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

В других вариантах осуществления, например, где композиция по настоящему изобретению содержит описанную в данном документе dsRNA и N-ацетилгалактозамин, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, дозу, составляющую от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизи-



[illegible]

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, приблизительно

 $0, 1, \quad 0, 2, \quad 0, 3,$ 

0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,4, 1,5,

1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8,  
 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1,  
 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4,  
 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7,  
 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,  
 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3,  
 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13,  
 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19,  
 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25,  
 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33,  
 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,

49

или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также считаются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 25 до приблизительно 900 мг, например, от приблизительно 25 до приблизительно 850 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 750 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 25 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 850 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 750 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 100 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 850 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 750 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 200 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 850 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 750 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 550 мг, от приблизительно 300 до приблизительно 500 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 850 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 800 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 750 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 700 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 650 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 600 мг, от приблизительно 400 до приблизительно 550 мг или от приблизительно 400 до приблизительно 500 мг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 12,5 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 95 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 175 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг или приблизительно 900 мг.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят субъекту в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или приблизительно 600 мг один раз в три месяца (т.е. один раз в квартал). В одном варианте осуществления введение представляет собой подкожное введение, например, самостоятельное введение с помощью, например, предварительно заполненного шприца или автоматического медицинского шприца. В некоторых вариантах осуществления доза средства для RNAi для подкожного введения содержится в объеме, составляющем один мл или меньше, например, фармацевти-

чески приемлемого носителя.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. При необходимости облегчить проведение повторяющихся или частых инфузий может быть целесообразной имплантация устройства для доставки, например насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интракостерального или внутрисуставного) или емкости. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения требуемого эффекта, например, подавления экспрессии гена TTR, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, снижения отложения амилоида или уменьшения интенсивности симптома ассоциированного с TTR заболевания.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в соответствии со схемой. Например, средство для RNAi можно вводить два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления схема предусматривает введения с равными интервалами, например, каждый час, каждые четыре часа, каждые шесть часов, каждые восемь часов, каждые двенадцать часов, ежедневно, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или ежеквартально. В одном варианте осуществления дозу, составляющую 0,3 мг/кг, 0,6 мг/кг, 1 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2, 2,5 мг/кг или 3 мг/кг, вводят ежемесячно. В другом варианте осуществления дозу, составляющую 0,3 мг/кг, 0,6 мг/кг, 1 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2, 2,5 мг/кг или 3 мг/кг, вводят ежеквартально.

В других вариантах осуществления схема предусматривает введения с небольшим интервалом с последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может предусматривать первичный набор доз, которые вводят в течение относительно короткого периода времени (например, приблизительно каждые 6 ч, приблизительно каждые 12 ч, приблизительно каждые 24 ч, приблизительно каждые 48 или приблизительно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, приблизительно 1 неделя, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель или приблизительно 12 недель), в течение которого средство для RNAi не вводят. В одном варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят каждый час, а затем вводят с более длительным интервалом (например, ежедневно, еженедельно, один раз в две недели, ежемесячно или ежеквартально). В другом варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят ежедневно, а затем вводят с более длительным интервалом (например, еженедельно, один раз в две недели, ежемесячно или ежеквартально). В определенных вариантах осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют на основе достижения требуемого эффекта.

В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение первой недели с последующим введением доз еженедельно, ежемесячно или ежеквартально, начиная с восьмого дня введения. В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят через день в течение первой недели с последующим введением доз еженедельно, ежемесячно или ежеквартально, начиная с восьмого дня введения. В другом варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение пяти дней первой недели с последующим введением доз еженедельно, ежемесячно или ежеквартально.

Любую из этих схем необязательно можно повторять с обеспечением одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения требуемого эффекта, например, подавления экспрессии гена TTR, уровня ретинолсвязывающего белка, уровня витамина A, и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, снижения отложения амилоида или уменьшения интенсивности симптома ассоциированного с TTR заболевания.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят с другими терапевтическими средствами или другими схемами терапии. Например, другие средства или другие схемы терапии, подходящие для лечения ассоциированного с TTR заболевания, могут включать трансплантацию печени, которая может снизить уровни мутантного TTR в организме; тафамидис (виндакель), который кинетически стабилизирует тетрамер TTR, предотвращая диссоциацию тетрамера, необходимую для TTR-амилоидогенеза; и диуретики, которые можно использовать, например, для уменьшения отека при TTR-амилоидозе с вовлечением сердца.

В одном варианте осуществления субъекту вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз средства для RNAi. Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или более низкими, чем начальная доза, например, в половину меньше начальной дозы. Схема поддерживающей терапии может включать лечение субъекта дозой или дозами, находящимися в диапазоне от 0,01 до 15 мг/кг веса тела в сутки, например 1 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,001 мг/кг или 0,00001 мг/кг веса тела в сутки, или дозой или дозами, составляющими от приблизительно 12,5 до приблизительно 900 мг, например, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 45 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 55 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 65 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 85 мг, прибли-

зительно 90 мг, приблизительно 95 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг, 200 мг, приблизительно 225 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 275 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 325 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 375 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 425 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 475 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 525 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 575 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 625 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 675 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 725 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 775 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 825 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 875 мг или приблизительно 900 мг в неделю. Поддерживающие дозы, например, вводят не чаще, чем один раз в 2 дня, один раз в 5 дней, один раз в 7 дней, один раз в 10 дней, один раз в 14 дней, один раз в 21 день, один раз в 30 дней или один раз в 90 дней. Кроме того, схема лечения может продолжаться в течение периода времени, который будет варьироваться в зависимости от природы конкретного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. В определенных вариантах осуществления дозу можно доставлять не более одного раза в день, например, не более одного раза в 24, 36, 48 или более часов, например, не более одного раза в 5 или 8 дней. После лечения пациента можно контролировать на предмет изменений в его/ее состоянии. Дозу средства для RNAi можно либо увеличить в случае, если пациент в достаточной степени не отвечает на текущие уровни доз, либо дозу можно снизить, если наблюдают облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние было ослаблено, или в случае наблюдения нежелательных побочных эффектов.

## VI. Наборы

В настоящем изобретении также предусмотрены наборы для выполнения любого из способов по настоящему изобретению. Такие наборы содержат одно или несколько средств для RNAi и инструкции по применению, например, инструкции касательно ингибирования экспрессии TTR в клетке путем приведения клетки в контакт со средством(средствами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии TTR. Наборы необязательно могут дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со средством для RNAi (например, устройство для инъекции или инфузионный насос) или средства для измерения степени ингибирования TTR (например, средства для измерения степени ингибирования экспрессии мРНК TTR или белка TTR). Такие средства для измерения степени ингибирования экспрессии TTR могут включать в себя средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образца плазмы крови. Наборы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Средства для RNAi, подходящие для включения в наборы по настоящему изобретению, включают любое из средств для RNAi, перечисленных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 или 7. В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-66016, AD-65492, AD-66017 и AD-66018.

Средство для RNAi может быть предусмотрен в любой удобной форме, такой как раствор в стерильной воде для инъекций. Например, средство для RNAi может быть предоставлено в виде раствора с концентрацией 500 мг/мл, 450 мг/мл, 400 мг/мл, 350 мг/мл, 300 мг/мл, 250 мг/мл, 200 мг/мл, 150 мг/мл, 100 мг/мл или 50 мг/мл в стерильной воде для инъекций.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Содержание всех ссылок и опубликованных патентов и заявок на патенты, цитируемых во всей данной заявке, тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

## Примеры

Пример 1. Стабильность и активность сайленсинга *in vitro* у химически модифицированных средств для RNAi, которые нацеливаются на TTR

В следующих экспериментах были продемонстрировано благоприятные эффекты определенных химических модификаций, в том числе не более 8 2'-фтор-модификаций в смысловой нити, не более 6 2'-фтор-модификаций в антисмысловой нити, шесть фосфотиоатных межнуклеотидных связей и лиганд, например, лиганд GalNAc<sub>3</sub>, на активность сайленсинга у средств для RNAi, которые нацеливаются на TTR. Последовательности исследуемых средств представлены в табл. 1 ниже.

Последовательности siRNA для TTR синтезировали в 1-микромолярном масштабе на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с использованием фосфорамидитной химии при опосредовании твердой подложки. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с заданным размером пор (500 Å), нагруженную созданным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-О-метил-PHK и дезоксофосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGENE (Китай). 2'-F-, 2'-О-метил, GNA (гликольнуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и модификации удаления азотистого основания вводили с использованием соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc на 3'-конце, выполняли на модифицированной GalNAc CPG-подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универсальную твердую CPG-подложку применяли для синтеза отдельных антисмысло-

вых нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин с использованием 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфотиоатные связи получали с использованием 50 мМ раствора 3-((диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дигидро-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 об/об). Время окисления составляло 3 мин. Все последовательности синтезировали с удалением в конечном итоге группы DMT ("без DMT").

По завершении твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки, и с них снимали защитные группы в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с использованием 200 мкл реагента в виде водного метиламина при 60°C в течение 20 мин. В конце стадии отщепления и снятия защитных групп планшету для синтеза позволяли нагреться до комнатной температуры, и его содержимое осаждали добавлением 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 ч и супернатант аккуратно сливали с помощью многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и обессоливали с использованием колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap на 5 мл (GE Healthcare) на системе АКТА Purifier, оснащенной устройством автоматической подачи образцов A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали с помощью LC-MS для подтверждения идентичности, УФ-излучения (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали с помощью ИЭХ-хроматографии для определения чистоты.

Гибридизацию отдельных нитей TTR выполняли на автоматическом устройстве Тесан для манипуляции с жидкостями. Эквивалентные смеси смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и обеспечивали гибридизацию в 96-луночных планшетах. После объединения отдельных комплементарных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали и нагревали в печи при 100°C в течение 10 мин, и позволяли ему медленно достичь комнатной температуры в течение периода 2-3 ч. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали до 10 мкМ в 1× PBS.

Эти дуплексы оценивали в отношении метаболической стабильности *in vitro* с помощью анализа стабильности в цитозоле крыс. Для проведения такого анализа цитозоль печени самки крысы (Xenotech, № по кат. R1500.C) размораживали до комнатной температуры и разводили до 1 мг/мл в 50 мМ буфере Tris-HCl, pH 7,4, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Образцы для момента времени двадцать четыре часа получали путем смешивания 100 мкл 1 мг/мл цитозоля с 25 мкл 0,4 мг/мл образца siRNA в микроцентрифужной пробирке и инкубирования в течение 24 ч в термомиксере для пробирок Eppendorf с установленными параметрами 37°C и 300 об./мин. После 24 ч инкубации в каждый образец добавляли 300 мкл загрузочного буфера для лизиса Phenomenex (№ по кат. ALO-8498) и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. Образцы для момента времени ноль часов получали путем смешивания 100 мкл 1 мг/мл цитозоля с 25 мкл 0,4 мг/мл образца siRNA, 300 мкл загрузочного буфера для лизиса Phenomenex и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. SiRNA экстрагировали из образцов для момента времени 24 ч и образцов момента времени 0 ч с использованием стартового набора Phenomenex Clarity OTX (№ по кат. KSO-8494). После экстракции образцов их переносили в микроцентрифужную пробирку и полностью высушивали с помощью концентратора Labconco CentriVar (№ по кат. 7810010). Затем образцы ресуспендировали с помощью 500 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Пятьдесят мкл каждого образца прогоняли на Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC в системе Agilent Technologies 6130 для квадрупольной LC/MS. Прогон в анализе осуществляли с использованием двухколоночной схемы организации в режиме регенерации. Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания четырехкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин со скоростью 0,400 мл/мин, по следующему графику.

| Функция времени | Параметр                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0,20            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 2,50            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 3,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                            |

Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания двухкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин со скоростью 0,700 мл/мин, по следующему графику.

**Функция времени  
Параметр**

| Функция времени | Параметр                                                       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| 0,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 0,40            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 10,00           | 60% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 40% буфера В (100% ACN) |
| 10,10           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 12,20           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |

Температура как левой, так и правой колонки была выставлена на 75,00°C. УФ-сигнал измеряли на длине волны 260 нм. Процентный остаток каждой нити рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$\% \text{ остатка нити} = 100 * (\text{площадь пика}_{\text{нить 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{нить 0 ч.}}) * (\text{площадь пика}_{\text{стандарт 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{стандарт 0 ч.}}).$$

Результаты этих двадцатичетырехчасовых анализов стабильности в цитозоле демонстрируют, что все дуплексы имеют высокую стабильность.

Подгруппу этих средств также оценивали в отношении метаболической стабильности in vitro с помощью анализа стабильности в тритосомах. Для анализов стабильности в тритосомах тритосомы печени крыс (продукт PR14044, созданный по индивидуальному заказу в Xenotech) размораживали до комнатной температуры и разводили до 0,5 единиц/мл кислой фосфатазы в буфере с 20 мМ цитрата натрия, pH 5,0. Образцы для момента времени 24 ч получали путем смешивания 100 мкл 0,5 единиц/мл тритосом с кислой фосфатазой с 25 мкл 0,4 мг/мл образца siRNA в микроцентрифужной пробирке и инкубирования в течение 24 ч в термомиксере для пробирок Eppendorf с установленными параметрами 37°C и 300 об./мин. После 24 ч инкубации в каждый образец добавляли 300 мкл загрузочного буфера для лизиса Phenomenex (№ по кат. ALO-8498) и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. Образцы для момента времени 0 ч получали путем смешивания 100 мкл 0,5 единиц/мл тритосом с кислой фосфатазой с 25 мкл 0,4 мг/мл образца siRNA, 300 мкл загрузочного буфера для лизиса Phenomenex и 12,5 мкл 0,4 мг/мл внутреннего стандарта siRNA. SiRNA экстрагировали из образцов для момента времени двадцать четыре часа и образцов для момента времени 0 ч с использованием стартового набора Phenomenex Clarity OTX (№ по кат. KSO-8494). После экстракции образцов их переносили в микроцентрифужную пробирку и полностью высушивали с помощью концентратора Labconco CentriVar (№ по кат. 7810010). Затем образцы ресуспендировали с помощью 500 мкл воды, не содержащей нуклеаз. 50 мкл каждого образца прогоняли на Agilent Technologies 1260 Infinity Binary LC в системе Agilent Technologies 6130 для квадрупольной LC/MS. Прогон в анализе осуществляли с использованием двухколоночной схемы организации в режиме регенерации. Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания четырехкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин со скоростью 0,400 мл/мин, по следующему графику.

| Функция времени | Параметр                                                          |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0,20            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 2,50            | 5% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 95% буфера В (100% метанол) |
| 3,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                            |

Прогон осуществляли с помощью способа, предусматривающего использование насоса для нагнетания двухкомпонентных смесей, в течение 12,20 мин со скоростью 0,700 мл/мин, по следующему графику.

| Функция времени | Параметр                                                       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| 0,00            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 0,40            | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 10,00           | 60% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP), 40% буфера В (100% ACN) |
| 10,10           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |
| 12,20           | 100% буфера А (16 мМ ТЕА, 200 мМ HFIP)                         |

Температура как левой, так и правой колонки была выставлена на 75,00°C. УФ-сигнал измеряли на длине волны 260 нм. Процентный остаток каждой нити рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$\% \text{ остатка нити} = 100 * (\text{площадь пика}_{\text{нить 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{нить 0 ч.}}) * (\text{площадь пика}_{\text{стандарт 24 ч.}} / \text{площадь пика}_{\text{стандарт 0 ч.}}).$$

Результаты 24 ч анализов стабильности в тритосомах, представленные на фиг. 1, демонстрируют, что все дуплексы имеют высокую стабильность в тритосомах.

Таблица 1. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для TTR

| ID дуплекса | ID смысловой нити | Последовательность смысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO | ID анти-смысловой нити | Последовательность антисмысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------|------------------------------------------|-----------|------------------------|----------------------------------------------|-----------|
| AD-51547    | A-106305          | UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfL96      | 15        | A-102978               | uCfuUfgGfgUfuCfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc       | 29        |
| AD-58142    | A-117240          | UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfgAfL96    | 16        | A-117241               | usCfsuUfgGfgUfuCfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc      | 30        |
| AD-64527    | A-128512          | usgsggauiucadTguaacaaagaL96              | 17        | A-128525               | usdCsuuggguadCaugdAaaucacasusc               | 31        |
| AD-65367    | A-128499          | usgsggAfuUfuCfAfUfgUfaaccaagAfL96        | 18        | A-128520               | usCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc               | 32        |
| AD-65489    | A-131365          | usgggauiucadTguaacaaagaL96               | 19        | A-128520               | usCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc               | 33        |
| AD-65481    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 20        | A-131364               | UfsCfsuugGfuuaacaugAfaAfucccasusc            | 34        |
| AD-65488    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 21        | A-131358               | PusCfsuugGfuuaacaugAfaAfucccasusc            | 35        |
| AD-65496    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 22        | A-131360               | PusCfsuugGfuuaacaugAfaAfucccasusc            | 36        |
| AD-65491    | A-128557          | usgsggauiucadTguaacY34aagaL96            | 23        | A-128525               | usdCsuuggguadCaugdAaaucacasusc               | 37        |
| AD-65495    | A-131353          | usgsggauUfuCfAfUfguaacCfaagaL96          | 24        | A-128516               | usCfsuugGfuUfaCfaugAfaAfucccasusc            | 38        |
| AD-65367    | A-128499          | usgsggAfuUfuCfAfUfgUfaaccaagAfL96        | 25        | A-128520               | usCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc               | 39        |
| AD-65493    | A-128512          | usgsggauiucadTguaacaaagaL96              | 26        | A-131366               | PusCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc              | 40        |
| AD-65494    | A-128512          | usgsggauiucadTguaacaaagaL96              | 27        | A-128526               | PusdCsuuggguadCaugdAaaucacasusc              | 41        |
| AD-64527    | A-128512          | usgsggauiucadTguaacaaagaL96              | 28        | A-128525               | usdCsuuggguadCaugdAaaucacasusc               | 42        |

Таблица 2. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

| Сокращение | Нуклеотид (нуклеотиды)              |
|------------|-------------------------------------|
| A          | Аденозин-3'-фосфат                  |
| Af         | 2'-Фторадеинозин-3'-фосфат          |
| Afs        | 2'-Фторадеинозин-3'-фосфотиоат      |
| As         | Аденозин-3'-фосфотиоат              |
| C          | Цитидин-3'-фосфат                   |
| Cf         | 2'-Фторцитидин-3'-фосфат            |
| Cfs        | 2'-Фторцитидин-3'-фосфотиоат        |
| Cs         | Цитидин-3'-фосфотиоат               |
| G          | Гуанозин-3'-фосфат                  |
| Gf         | 2'-Фторгуанозин-3'-фосфат           |
| Gfs        | 2'-Фторгуанозин-3'-фосфотиоат       |
| Gs         | Гуанозин-3'-фосфотиоат              |
| T          | 5'-Метилуридин-3'-фосфат            |
| Tf         | 2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфат     |
| Tfs        | 2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат |
| Ts         | 5-Метилуридин-3'-фосфотиоат         |
| U          | Уридин-3'-фосфат                    |
| Uf         | 2'-Фторуридин-3'-фосфат             |
| Ufs        | 2'-Фторуридин-3'-фосфотиоат         |
| Us         | Уридин-3'-фосфотиоат                |
| N          | Любой нуклеотид (G, A, C, T или U)  |
| a          | 2'-О-Метиладенозин-3'-фосфат        |
| as         | 2'-О-Метиладенозин-3'-фосфотиоат    |
| c          | 2'-О-Метилцитидин-3'-фосфат         |
| cs         | 2'-О-Метилцитидин-3'-фосфотиоат     |
| g          | 2'-О-Метилгуанозин-3'-фосфат        |
| gs         | 2'-О-Метилгуанозин-3'-фосфотиоат    |
| t          | 2'-О-Метил-5-метилтимин-3'-фосфат   |

|       |                                                                                                   |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ts    | 2'-О-Метил-5-метилтимин-3'-фосфотиоат                                                             |
| u     | 2'-О-Метилуридин-3'-фосфат                                                                        |
| us    | 2'-О-Метилуридин-3'-фосфотиоат                                                                    |
| s     | Фосфотиоатная связь                                                                               |
| L96   | N-[трис (GalNAc-алкил)-амидодеканойл]-4-гидроксипропиол-Нур-(GalNAc-алкил) 3                      |
| dA    | Дезоксиаденозин                                                                                   |
| dC    | Дезоксицитозин                                                                                    |
| dG    | Дезоксигуанозин                                                                                   |
| (dT)  | 2'-Дезокситимидин-3'-фосфат                                                                       |
| Y34   | 2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе-фураноза) |
| Y44   | 2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат                                                           |
| (Cgn) | Цитидингликольнуклеиновая кислота (GNA)                                                           |
| P     | Фосфат                                                                                            |
| VP    | Винилфосфат                                                                                       |

Конструировали и синтезировали дополнительный набор средств, нацеливающихся на TTR. Последовательности этих средств представлены в табл. 3 ниже.

Эти дополнительные средства оценивали в анализах *in vitro*. В частности, IC<sub>50</sub> для каждого средства на основе iRNA определяли в клетках Hep3B (линия клеток гепатомы человека) или в первичных гепатоцитах яванского макака (Life Technologies) путем стандартной обратной трансфекции с помощью Lipofectamine RNAiMAX. Клетки Hep3b культивировали в EMEM с 10% FBS, а первичные гепатоциты яванского макака размораживали непосредственно перед применением и культивировали в WMEM с 10% FBS. Обратную трансфекцию осуществляли путем добавления 5 мкл РНК-дуплекса на лунку в 384-луночный планшет вместе с 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) и инкубации при комнатной температуре в течение 15-20 мин. Затем после инкубации в каждую лунку добавляли 40 мкл полной среды для роста без антибиотиков, содержащей 5000 клеток Hep3B или первичных гепатоцитов яванского макака. Для первичных гепатоцитов использовали покрытые коллагеном планшеты. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> перед осуществлением лизиса и анализа мРНК TTR и GAPDH с помощью RT-qPCR. Для определения IC<sub>50</sub> оценивали восемь разных концентраций siRNA в диапазоне от 10 нМ до 0,38 фМ, и уровни TTR/GAPDH для трансфицированных siRNA клеток нормализовали по клеткам, трансфицированным 10 нМ siRNA для гена люциферазы.

После инкубации с siRNA для TTR в течение 24 ч оценивали сайленсинг при свободном поглощении в первичных гепатоцитах яванского макака. Способ был аналогичен описанному выше за исключением того, что 5 мкл полной среды для роста заменяли 5 мкл, содержащими Lipofectamine RNAiMax и OptiMEM. Последующий анализ в отношении мРНК TTR и GAPDH выполняли, как описано выше. Для построения стандартной кривой зависимости доза-эффект siRNA титровали от 500 нМ до 0,18 пМ путем 6-кратного серийного разведения по восьми точкам.

Результаты этих анализов (представленные в табл. 4) демонстрируют, что все дуплексы действительно ингибируют экспрессию мРНК TTR.

Стабильность этих дополнительных средств *in vitro* также оценивали с помощью анализов стабильности в цитозоле и тритосомах, описанных выше.

Результаты двадцатичетырехчасового анализа стабильности в цитозоле представлены на фиг. 2А, а результаты двадцатичетырехчасового анализа стабильности в тритосомах представлены на фиг. 2В, и они демонстрируют, что все дуплексы имеют высокую стабильность в тритосомах и цитозоле крыс.

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для TTR

| ID дуплекса | ID смысловой нити | Последовательность смысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO | ID анти-смысловой нити | Последовательность антисмысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------|------------------------------------------|-----------|------------------------|----------------------------------------------|-----------|
| AD-66016    | A-131354          | usgsgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 43 или 10 | A-128520               | usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc                | 47 или 6  |
| AD-65492    | A-131354          | usgsgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 44 или 10 | A-131359               | usCfsuugGfuuaCfaugAfaAfucccasusc             | 48 или 7  |
| AD-66017    | A-131354          | usgsgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 45 или 10 | A-131903               | UfsCfsuugGfuuaCfaugAfaAfucccasusc            | 49 или 8  |
| AD-66018    | A-131354          | usgsgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 46 или 10 | A-131902               | VPusCfsuugGfuuaCfaugAfaAfucccasusc           | 50 или 9  |



Таблица 4. Активность дополнительных средств для RNAi TTR in vitro

|                                   | AD-66016 (65367 AS) |                      | AD-65492 (u) |                      | AD-66017 (UF) |                      | AD-66018 (VPu) |                      |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|--------------|----------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|
| IC50 (нМ)                         | Трансфекция         | Свободное поглощение | Трансфекция  | Свободное поглощение | Трансфекция   | Свободное поглощение | Трансфекция    | Свободное поглощение |
| НерЗб                             | 0,931               | нет данных           | 0,722        | нет данных           | 0,108         | нет данных           | 0,053          | нет данных           |
| Гепатоциты<br>яванского<br>макака | 0,235               | 5,157                | 0,21         | 3,629                | 0,026         | 0,284                | 0,015          | 0,191                |

## Пример 2. Сайленсинг TTR in vivo

Эффективность in vivo дополнительных средств, описанных выше, оценивали на трансгенных мышах, которые экспрессировали вариант TTR человека с заменой валина 30 на метионин (V30M hTTR) (см., например, Nagata, et al. (1995) J Biochem. 117:169-175; Kohno, et al. (1997) Am J Pathol. 150 (4):1497-508). Известно, что вариант V30M TTR является причиной семейной амилоидной полинейропатии I типа у людей. См., например, Lobato, L. (2003) J Nephrol. 16 (3) :438-42.

Мышам с TTR V30m в возрасте одиннадцати-тринадцати месяцев подкожно вводили разовую дозу 1 или 2,5 мг/кг средств, и в сыворотке крови животных определяли уровень TTR до введения дозы и в дни 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 70 и 84 после введения дозы. Вкратце, уровни TTR анализировали с помощью валидированного твердофазного иммуноферментного анализа TTR (ELISA) (см., например, Coelho, et al. (2013) N Engl J Med 369:819). Девяностошестилуночные иммунологические микропланшеты покрывали при 4°C антителом pAb кролика к TTR человека (Abcam) за 24 ч до начала анализа белка TTR в сыворотке крови методом ELISA. В день анализа планшеты промывали с помощью TBS-T и блокировали с помощью 1X Powerblock (Biogenex) в течение 2 ч при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови разводили в 15000 раз с помощью 1X Powerblock. Калибровочную кривую для TTR человека по 12 точкам строили с использованием стандарта белка TTR человека (Sigma-Aldrich, P1742), применяя 1,6× серийные разведения в диапазоне от 250 до 0 нг/мл. После блокирования в планшет добавляли стандарты и образцы в объемах 100 мкл и оставляли инкубироваться в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали с помощью TBS-T и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичным антителом овцы к hTTR (AbCam), разведенном 1:2500 в 1X Powerblock. После промывки с помощью TBS-T планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичным антителом ослы к иммуноглобулинам овцы, конъюгированным со щелочной фосфатазой (AbCam), разведенным 3:10000 в 1X Powerblock. Планшеты промывали с помощью TBS-T и добавляли полученный субстрат (таблетки п-нитрофенилфосфата SIGMAFAST™) в объеме 100 мкл на лунку и оставляли для реакции в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Реакционные смеси гасили с помощью 0,05 мл 1 M NaOH на лунку. Поглощение при 405 нм считывали на планшет-ридере Spectra-Max, и данные аппроксимировали 4-параметрической кривой для определения уровней белка TTR в сыворотке крови в мкг/мл. Уровни белков отдельных животных нормализовали по их соответствующим индивидуальным значениям уровней белков в плазме крови до введения дозы, чтобы определить остаточную долю TTR по сравнению с количеством до введения дозы.

Результаты экспериментов с разовой дозой 1 мг/кг представлены на фиг. 3, а результаты экспериментов с разовой дозой 2,5 мг/кг представлены на фиг. 4. Результаты демонстрируют, что все средства действительно и продолжительно ингибируют экспрессию TTR, причем максимальное снижение достигается приблизительно в день 7 после введения. Результаты также демонстрируют, что в день 42 после введения разовой дозы 1 мг/кг AD-65492, AD-66017 или AD-66018 подавление экспрессии TTR в сыворотке крови сохраняется на уровне более 40%, а в день 42 после введения разовой дозы 2,5 мг/кг AD-65492 или AD-66018 подавление экспрессии TTR в сыворотке крови сохраняется на уровне более 60%. Восстановление до исходных концентраций TTR в сыворотке крови происходит между днями 56 и 84 после введения разовой дозы 1 мг/кг и между днями 70 и 84 после введения разовой дозы 2,5 мг/кг.

Рассчитанная эффективная доза для 80% сайленсинга у животных (ED<sub>80</sub>) составляла 1 мг/кг. Таким образом, эти данные указывают, что AD-65492, AD-66016, AD-66017 и AD-66018 эффективны для лечения субъекта, у которого имеется нарушение, ассоциированное с TTR, при схемах введения низкой дозы и/или ежемесячного введения дозы.

## Пример 3. Поисковое исследование токсичности у крыс

На крысах также проводили доклинические исследования токсичности AD-66016, AD-65492, AD-66017 и AD-66018. Вкратце, в дни 1, 8 и 15 пяти самцам крыс на группу подкожно вводили дозу 30 мг/кг либо 100 мг/кг AD-66016, AD-65492, AD-66017 или AD-66018. Контрольным животным вводили плацебо в дни 1, 8 и 15. В день 16 всех животных умерщвляли. До умерщвления животных ежедневно проверяли на наличие любых клинических симптомов и еженедельно измеряли значения веса тела. После умерщвления животным проводили вскрытие, и образцы анализировали с помощью полной панели биохимических, гематологических и коагуляционных анализов сыворотки крови, путем гистопатологического анализа печени и почек и по концентрации печеночных трансаминаз.

Результаты этих анализов демонстрируют, что AD-66016, AD-65492, AD-66017 и AD-66018 характеризуются хорошей клинической переносимостью без неблагоприятных клинических признаков или изменений веса тела.

#### Пример 4. Эффективность введения нескольких доз AD-65492 и AD-66017

Оценивали эффект схемы введения нескольких доз AD-65492 и AD-66017 в отношении экспрессии белка TTR у трансгенных (Tg) по hTTR V30M мышей.

В одной серии экспериментов мышам з hTTR V30M в возрасте одиннадцати-тринадцати месяцев еженедельно подкожно вводили дозу 2 мг/кг AD-65492 в течение трех недель (QW×3), и уровень белка TTR определяли в сыворотке крови животных до введения дозы и в дни 7, 14, 17 и 21 после введения дозы, как описано выше.

На фиг. 5 продемонстрировано, что путем введения AD-65492 Tg-мышам по hTTR V30M при схеме введения доз QW×3 достигалось и поддерживалось более чем 90% подавления экспрессии белка TTR в сыворотке крови.

В другой серии экспериментов Tg-мышам по hTTR V30M в возрасте одиннадцати-тринадцати месяцев подкожно вводили AD-65492 и AD-66017 в дозе 0,3 мг/кг один раз в месяц в течение четырех месяцев (QM×4 в количестве 0,3 мг/кг), в дозе 1 мг/кг один раз в месяц в течение четырех месяцев (QM4 в количестве 1 мг/кг) или в дозе 3 мг/кг один раз в месяц в течение четырех месяцев (QM4 в количестве 3 мг/кг). Уровни белка TTR в сыворотке крови определяли, как описано выше, до введения дозы и в дни 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 84, 91, 98 и 185 после введения дозы.

Как показано на фиг. 6A-6C, уровни нокдауна TTR в день 7 после введения дозы были аналогичны уровням после второй, третьей и четвертой доз, и максимальное снижение экспрессии TTR, достигаемое при дозе 3 мг/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг, составляло более чем 80%, приблизительно 70-85% и приблизительно 25-35% соответственно. На этих графиках также продемонстрировано, что AD-65492 обеспечивает более устойчивый уровень сайленсинга TTR, чем AD-66017, в течение более 100 дней после введения последней дозы, при этом остаточное подавление экспрессии TTR составляет приблизительно 60%, 40% и приблизительно 35% при 3 мг/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг соответственно. Более того, для AD-65492 введение нескольких доз (QM×4) имеет аддитивный эффект в дозе 0,3 мг/кг, приводя к приблизительно 40% нокдауну TTR после введения четвертой ежемесячной дозы по сравнению с первой дозой, для которой нокдаун составляет приблизительно 25-35%. Кроме того, хотя перед каждой ежемесячной дозой на всех уровнях дозы для каждого средства наблюдалось некоторое восстановление уровней белка TTR, как для разовой подкожной дозы, расчетная эффективная доза для достижения 80% нокдауна (ED<sub>80</sub>) в схемах введения нескольких доз составляла приблизительно 1 мг/кг. Таким образом, фармакодинамическая активность и кинетика обоих соединений во всех трех схемах введения доз были сопоставимы с фармакодинамической активностью и кинетикой тех же соединений при введении их в разовой дозе.

#### Пример 5. Сайленсинг TTR у приматов, отличных от человека

Как продемонстрировано в приведенных выше примерах, AD-65492 и AD-66017 характеризуются хорошей переносимостью и действенно и продолжительно подавляют уровни белка TTR *in vivo*.

Соответственно, эффективность AD-65492 и AD-66017 дополнительно исследовали путем введения различных доз и применения различных схем введения доз этих средств на основе iRNA у яванских макак. На фиг. 7 представлен общий принцип этого исследования. Вкратце, четырем группам, группам 1, 2, 4 и 5, подкожно вводили разовую дозу 0,3 мг/кг (группы 1 и 4) либо разовую дозу 1 мг/кг (группы 2 и 5) средства на основе iRNA. Четырем другим группам, группам 3 и 6-8, вводили ежемесячную дозу 1 мг/кг в течение 4 месяцев (QM×4) (группы 7 и 8) либо ежемесячную дозу 3 мг/кг в течение 4 месяцев (QM×4) (группы 3 и 6). Сыворотку крови собирали в дни -7 и -1 до введения дозы и в дни 3, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84, 91, 105 и 119 после введения дозы; плазму крови собирали в день 1 до введения дозы и через 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 ч после введения дозы. Уровень белка TTR в сыворотке крови определяли, как описано выше.

На фиг. 8A представлены результаты исследования с разовой дозой 0,3 мг/кг, на фиг. 8B представлены результаты исследования с разовой дозой 1 мг/кг, и на фиг. 8C представлены результаты исследования с разовой дозой 3 мг/кг. В целях сравнения на фиг. 8B также изображен эффект от введения разовой подкожной дозы 2,5 мг/кг AD-51547 в отношении экспрессии TTR у яванских макак, и на фиг. 8C также изображен эффект от введения разовой подкожной дозы 5 мг/кг AD-51547 в отношении экспрессии TTR у яванских макак. На этих графиках продемонстрировано, что ED<sub>50</sub> для обоих средств на основе iRNA, AD-65492 и AD-66017, составляет приблизительно 0,3 мг/кг, что максимальное снижение экспрессии TTR для обеих доз и для обоих средств на основе iRNA достигается приблизительно в день 28, и что AD-65492 является более эффективным в подавлении экспрессии белка TTR, чем AD-66017, на более высоком уровне дозы при введении разовой дозы. На графиках также продемонстрировано, что AD-65492 обеспечивает более чем 90% устойчивое подавление экспрессии TTR вплоть до дня 42 после введения разовой дозы 1 мг/кг и более чем 80% подавление экспрессии TTR вплоть до дня 63, при этом ко дню 119 после введения дозы остаточное подавление экспрессии TTR составляет приблизительно 40%, и что AD-66017 обеспечивает максимальное подавление экспрессии TTR на уровне 73% после введения разовой дозы 1 мг/кг с восстановлением экспрессии TTR, начинающимся ко дню 35, и восстановлением до значений в пределах приблизительно 20% от исходного уровня ко дню 119 после введения дозы.

На фиг. 9A представлены результаты исследования с несколькими дозами 1 мг/кг и на фиг. 9B

представлены результаты исследования с несколькими дозами 3 мг/кг для AD-65492 и AD-66017. В целях сравнения на фиг. 9А также изображен эффект от введения ежедневной дозы 5 мг/кг AD-51547 в течение 5 дней (первые пять стрелок, что соответствуют дням 0-4) с последующим введением еженедельной дозы 5 мг/кг в течение четырех недель (стрелки, что соответствуют дням 7, 14, 21 и 28) (QD×5, QW×4) в отношении экспрессии TTR у яванских макаков. На графиках продемонстрировано, что оба средства на основе iRNA обеспечивают устойчивое подавление экспрессии белка TTR, и что оба средства на основе iRNA полностью подавляют экспрессию белка TTR между днями 21 и 28 в дозе 3 мг/кг. На графиках также продемонстрировано, что AD-65492 является более эффективным, чем AD-66017, в дозе 1 мг/кг. Кроме того, на графиках продемонстрировано, что максимальное снижение экспрессии TTR для обоих средств на основе iRNA при 1 мг/кг достигается между днями 35 и 42 с более чем 85% подавлением перед введением второй ежемесячной дозы AD-65492 и приблизительно 70% подавлением перед введением второй ежемесячной дозы AD-66017. После введения третьей и четвертой ежемесячных доз AD-65492 и AD-66017 достигали поддержания подавления на уровне приблизительно 95 и 85% соответственно.

Более того, как продемонстрировано на фиг. 10А, ежемесячное введение дозы (QM×4) AD-65492 приводит к поддержанию более чем 95% подавления экспрессии TTR и, как продемонстрировано на фигуре 10В, введение нескольких доз (QM×4) AD-66017 имеет аддитивный эффект в дозе 1 мг/кг. На фиг. 10В также продемонстрировано, что после второй ежемесячной дозы AD-66017 наблюдается 85% подавление экспрессии белка TTR, и что это подавление поддерживается третьей и четвертой ежемесячными дозами.

Пример 6. Конструирование и синтез химически модифицированных средств, нацеливающихся на TTR

Дополнительные двухнитевые средства для RNAi, нацеливающиеся на TTR, в которых, по сути, все нуклеотиды смысловой нити и, по сути, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, и содержащие антисмысловую нить, которая содержит участок комплементарности к SEQ ID NO: 2, конструировали и синтезировали, как описано выше.

Нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой нитей этих средств представлены в табл. 5.

Пример 7. Конструирование и синтез химически модифицированных средств, нацеливающихся на TTR

Дополнительные двухнитевые средства для RNAi, нацеливающиеся на TTR, конструировали и синтезировали, как описано выше.

Нуклеотидные последовательности немодифицированных смысловой и антисмысловой нитей этих средств представлены в табл. 6, а нуклеотидные последовательности модифицированных смысловой и антисмысловой нитей этих средств представлены в табл. 7.

Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для TTR

| ID дуплекса | ID смысловой нити | Последовательность смысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO | ID антисмысловой нити | Последовательность антисмысловой нити, 5'-3' | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------|------------------------------------------|-----------|-----------------------|----------------------------------------------|-----------|
| AD-65496    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 51        | A-131360              | PusCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                | 93        |
| AD-65488    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 52        | A-131358              | PusCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                | 94        |
| AD-65474    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 53        | A-131362              | PusCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                | 95        |
| AD-65478    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 54        | A-131363              | UfsCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                | 96        |
| AD-65493    | A-128512          | usgsggauuucadTguaaccaagaL96              | 55        | A-131366              | PusCfsuugguuacAfaaAfaucccasusc               | 97        |
| AD-65481    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 56        | A-131364              | UfsCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                | 98        |
| AD-65489    | A-131365          | usgggauuucadTguaaccaagaL96               | 57        | A-128520              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccasusc                | 99        |
| AD-65495    | A-131353          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 58        | A-128516              | usCfsuugGfuUfAfaAfaucccasusc                 | 100       |
| AD-65482    | A-131373          | usagsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 59        | A-131374              | usCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                 | 101       |
| AD-65468    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 60        | A-128516              | usCfsuugGfuUfAfaAfaucccasusc                 | 102       |
| AD-65367    | A-128499          | usgsggAfuUfuCfAfUfguaaccaagaL96          | 61        | A-128520              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccasusc                | 103       |
| AD-65485    | A-128512          | usgsggauuucadTguaaccaagaL96              | 62        | A-128520              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccasusc                | 104       |
| AD-65470    | A-131367          | gsgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96             | 63        | A-131369              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccsa                   | 105       |
| AD-65469    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 64        | A-131361              | usCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                 | 106       |
| AD-65473    | A-131355          | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 65        | A-131356              | usCfuugGfuUfAfaAfaucccasusc                  | 107       |
| AD-65484    | A-131355          | usgggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 66        | A-131357              | usCfuugGfuuaAfaAfaucccasusc                  | 108       |
| AD-65477    | A-131353          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 67        | A-128517              | usCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                 | 109       |
| AD-65497    | A-131367          | gsgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96             | 68        | A-131368              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccsa                   | 110       |
| AD-65475    | A-131370          | gsgsauUfuCfAfUfguaaccaagaL96             | 69        | A-131371              | usCfuugguuacAfaaAfaucccsa                    | 111       |
| AD-65480    | A-131354          | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 70        | A-128517              | usCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                 | 112       |
| AD-65479    | A-131372          | gsgsauuucAfuUfguaaccaagaL96              | 71        | A-131369              | usCfsuugguuacAfaaAfaucccsa                   | 113       |
| AD-65492    |                   | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96           | 72        |                       | usCfsuugGfuuaAfaAfaucccasusc                 | 114       |
| AD-65494    | A-1285120         | usgsggauuucadTguaaccaagaL96              | 73        | A-128526              | PusdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc              | 115       |
| AD-65499    | A-128557          | usgsggauuucadTguaacY34aagaL96            | 74        | A-128526              | PusdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc              | 116       |
| AD-65491    | A-128557          | usgsggauuucadTguaacY34aagaL96            | 75        | A-128525              | usdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc               | 117       |
| AD-65498    | A-1285121         | usgsggauuucadTguaaccaagaL96              | 76        | A-131375              | UfsdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc              | 118       |
| AD-65490    | A-128512          | usgsggauuucadTguaaccaagaL96              | 77        | A-128553              | usdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc               | 119       |
| AD-64520    | A-128557          | usgsggauuucadTguaacY34aagaL96            | 78        | A-128553              | usdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc               | 120       |

|          |           |                                      |    |           |                                       |     |
|----------|-----------|--------------------------------------|----|-----------|---------------------------------------|-----|
| AD-64527 | A-128512  | usgsggauuucadTguaacaaagaL96          | 79 | A-128525  | usdCsuuggguuadCaugdAaaucccasusc       | 121 |
| AD-65472 | A-131376  | gsgsauuucadTguaacaaagaL96            | 80 | A-131377  | usdCsuuggguuadCaugdAaaucscsa          | 122 |
| AD-65486 | A-128557  | usgsggauuucadTguaacY34aagaL96        | 81 | A-128520  | usCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc        | 123 |
| AD-65472 | A-131376  | gsgsauuucadTguaacaaagaL96            | 82 | A-131377  | usdCsuuggguuadCaugdAaaucscsa          | 124 |
| AD-64515 |           | usgsggauuucadTguaac (Cgn) aagaL96    | 83 |           | usdCsuuggguuadCaugdAaaucccasusc       | 125 |
| AD-64536 |           | usgsggauuucadTguaac (Cgn) aagaL96    | 84 |           | usdCsuuggguuadCsaugdAaaucccasusc      | 126 |
| AD-65471 |           | usgsggauuucadTguaac (Cgn) aagaL96    | 85 |           | usCfsuuggguuacaugAfaaucccasusc        | 127 |
| AD-65483 |           | usgsggauuucadTguaac (Cgn) aagaL96    | 86 |           | FusdCsuuggguuadCaugdAaaucccasusc      | 128 |
| AD-59152 | A-106305  | UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfAFL96   | 87 | A-119923  | PuCfuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc | 129 |
| AD-65476 | A-106305  | UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfAFL96   | 88 | A-131351  | UfCfuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc | 130 |
| AD-64480 | A-128493  | UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfCfaAfAFL96 | 89 | A-128495  | PusCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc | 131 |
| AD-51547 | A-106305  | UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaacCfaAfAFL96   | 90 | A-1029782 | uCfuUfgGfUfUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc  | 132 |
| AD-65487 | A-1284937 | UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfCfaAfAFL96 | 91 | A-131352  | UfsCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc | 133 |
| AD-64474 | A-1284935 | UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfCfaAfAFL96 | 92 | A-1284947 | usCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc  | 134 |

Таблица 6. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для TTR

| ID дуплекса | Последовательность смысловой нити (5'-3') | SEQ ID NO | Сайт начала антисмысловой нити относительно NM 000371.2 | Последовательность антисмысловой нити (5'-3') | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|
| AD-68322    | AUGGGAUUUCAUGUAACCAAAA                    | 135       | 504                                                     | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUCC                       | 167       |
| AD-60668    | AUGGGAUUUCAUGUAACCAAAA                    | 136       | 504                                                     | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUCC                       | 168       |
| AD-68330    | AUGGGAUUUCAUGUAACCAAAA                    | 137       | 504                                                     | UUUGGUUACAUGAAAUCCCAUCC                       | 169       |
| AD-64474    | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA                     | 138       | 505                                                     | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC                       | 170       |
| AD-65468    | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA                     | 139       | 505                                                     | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC                       | 171       |
| AD-65492    | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA                     | 140       | 505                                                     | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC                       | 172       |
| AD-65480    | UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA                     | 141       | 505                                                     | UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC                       | 173       |
| AD-60636    | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU                     | 142       | 510                                                     | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC                       | 174       |
| AD-68320    | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU                     | 143       | 510                                                     | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC                       | 175       |
| AD-68326    | UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU                     | 144       | 510                                                     | AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC                       | 176       |
| AD-60611    | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUAU                    | 145       | 515                                                     | AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG                       | 177       |
| AD-68331    | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUAU                    | 146       | 515                                                     | AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG                       | 178       |
| AD-68315    | UGUAACCAAGAGUAUUCCAUAU                    | 147       | 515                                                     | AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG                       | 179       |
| AD-68319    | AACCAAGAGUAUUCCAUAUUUU                    | 148       | 518                                                     | AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC                       | 180       |
| AD-60612    | AACCAAGAGUAUUCCAUAUUUU                    | 149       | 518                                                     | AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC                       | 181       |
| AD-68316    | AACCAAGAGUAUUCCAUAUUUU                    | 150       | 518                                                     | AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC                       | 182       |
| AD-60664    | UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU                     | 151       | 534                                                     | AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG                       | 183       |
| AD-68321    | UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU                     | 152       | 534                                                     | AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG                       | 184       |
| AD-68318    | UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU                     | 153       | 534                                                     | AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG                       | 185       |
| AD-60665    | UUACUAAAGCAGUGUUUUCAA                     | 154       | 537                                                     | UGGAAAACACUGCUUUAGUAAAA                       | 186       |
| AD-60642    | CUAAAGCAGUGUUUUACCCUA                     | 155       | 540                                                     | UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA                       | 187       |
| AD-68329    | CUAAAGCAGUGUUUUACCCUA                     | 156       | 540                                                     | UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA                       | 188       |
| AD-68334    | CUAAAGCAGUGUUUUACCCUA                     | 157       | 540                                                     | UAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA                       | 189       |
| AD-68328    | GGCAGAGACAAUAAAACAUUA                     | 158       | 582                                                     | UAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCCUG                      | 190       |
| AD-68333    | GGCAGAGACAAUAAAACAUUA                     | 159       | 582                                                     | UAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCCUG                      | 191       |
| AD-60639    | GGCAGAGACAAUAAAACAUUA                     | 160       | 582                                                     | UAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCCUG                      | 192       |
| AD-60643    | CAGAGACAAUAAAACAUUCCU                     | 161       | 584                                                     | AGGAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCC                      | 193       |
| AD-68317    | CAGAGACAAUAAAACAUUCCU                     | 162       | 584                                                     | AGGAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCC                      | 194       |
| AD-68335    | CAGAGACAAUAAAACAUUCCU                     | 163       | 584                                                     | AGGAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCC                      | 195       |
| AD-68327    | CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA                     | 164       | 590                                                     | UUUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUC                      | 196       |
| AD-68332    | CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA                     | 165       | 590                                                     | UUUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUC                      | 197       |
| AD-60637    | CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA                     | 166       | 590                                                     | UUUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUC                      | 198       |

Таблица 7. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA для TTR

| ID дуплекса | Последовательность смысловой нити (5'-3') | SEQ ID NO | Последовательность антисмысловой нити (5'-3') | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|-----------|
| AD-68322    | asusgggaUfuUfCfAfuguaaccaaaL96            | 199       | usUfsuggUfuAfCfaugaAfaUfccauscsc              | 231       |
| AD-60668    | AfsusGfgGfaUfuUfCfAfuguaafafCfaAfL96      | 200       | usUfsuGfgUfuAfCfugaAfaUfCfCfAfuscsc           | 232       |
| AD-68330    | asusgggaUfuUfCfAfuguaaccaaaL96            | 201       | usUfsuggUfuacaugaAfaUfccauscsc                | 233       |
| AD-64474    | UfsgaCfGfaUfuUfCfAfUfgUfaAfCfaAfAFL96     | 202       | usCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasuac          | 234       |
| AD-65468    | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 203       | usCfsuugGfuUfAfcaugAfaAfucccasusc             | 235       |
| AD-65492    | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 204       | usCfsuugGfuUfAfcaugAfaAfucccasusc             | 236       |
| AD-65480    | usgsggauUfuCfAfUfguaaccaagaL96            | 205       | usCfsuugGfuUfAfcaugAfaAfucccasusc             | 237       |
| AD-60636    | UfsusUfCfAfUfGfuAfAfCfCfaGfaGfuUfuUfL96   | 206       | asAfsuAfCfUfCfUfGfuuAfCfAfGfaFasusc           | 238       |
| AD-68320    | usfsusauGfuAfAfCfCfaagaguuuuL96           | 207       | asAfsuacUfCfUfUfGfuuAfCfAfugaasusc            | 239       |
| AD-68326    | usfsuauGfuAfAfCfCfaagaguuuuL96            | 208       | asAfsuacUfCfUfUfGfuuAfCfAfugaasusc            | 240       |
| AD-60611    | UfsgsUfaAfCfCfaAfGfAfGfuUfuUfCfAfUfL96    | 209       | asAfsuGfgAfaUfaCfcuUfGfUfaCfasusg             | 241       |
| AD-68331    | usgsuaacCfaAfGfAfGfuauuccauuL96           | 210       | asAfsuggAfaUfAfCfucUfGfUfaucasusg             | 242       |
| AD-68315    | usgsuaacCfaAfGfAfGfuauuccauuL96           | 211       | asAfsuggAfauacucuUfGfUfaucasusg               | 243       |
| AD-68319    | asasccaaGfaGfUfAfFuuccauuuuuL96           | 212       | asAfsaaaUfgGfAfauacUfCfUfugguusasc            | 244       |
| AD-60612    | AfsasCfCfaGfaGfUfAfUfCfCfaUfuUfL96        | 213       | asAfsaAfaUfgGfAfuaucUfCfUfGfUfasasc           | 245       |
| AD-68316    | asasccaaGfaGfUfAfFuuccauuuuuL96           | 214       | asAfsaaaUfggaauacUfCfUfugguusasc              | 246       |
| AD-60664    | UfsusUfuUfaCfAfAfAfGfCfaGfGfuUfuUfL96     | 215       | asAfsaAfCfCfUfGfUfuUfGfUfaFasusg              | 247       |
| AD-68321    | usfsuuuaCfuAfAfAfGfaguuuuuuL96            | 216       | asAfsaacAfCfUfGfUfuUfGfUfaaaaausg             | 248       |
| AD-68318    | usfsuuuaCfuAfAfAfGfaguuuuuuL96            | 217       | asAfsaacAfCfUfGfUfuUfGfUfaaaaausg             | 249       |
| AD-60665    | UfsusAfCfUfaAfAfGfCfAfGfUfuUfCfAfL96      | 218       | usUfsgAfaAfAfCfAfGfUfuUfGfUfasasa             | 250       |
| AD-60642    | CfsusAfaAfGfCfAfGfUfGfUfuUfCfAfL96        | 219       | usAfsGfGfUfaAfAfCfCfUfGfUfuAfsusa             | 251       |
| AD-68329    | csusaagCfaGfUfGfuuuuccauuL96              | 220       | usAfsGguGfaaaacacUfGfCfuuuagsusa              | 252       |
| AD-68334    | csusaagCfaGfUfGfuuuuccauuL96              | 221       | usAfsGguGfaAfAfCfCfUfGfUfuuagsusa             | 253       |
| AD-68328    | gsgscagaGfaCfAfAfuaaaacauuL96             | 222       | usAfsaugUfuuuuugUfUfCfGccusg                  | 254       |

Эффективность AD-65492 дополнительно оценивали путем введения яванским макакам.

Специалисты в данной области распознают или будут способны определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты к конкретным вариантам осуществления и способам, описанным в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии транскрипта (TTR) в клетке, где указанное средство RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, и образующее двухнитевый участок, где указанная смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA-3' (SEQ ID NO: 2) и указанная антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC-3' (SEQ ID NO: 3),

где, по существу, все нуклеотиды смысловой нити и, по существу, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций;

где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций;

где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом и где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный линкер.

2. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

3. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метилмодифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтилмодифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиранмодифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенилмодифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, и их комбинаций.

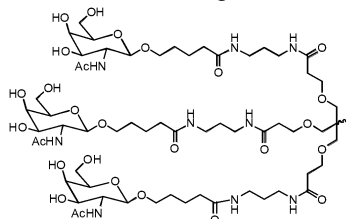
4. Двухнитевое средство RNAi по п.3, где модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

5. Двухнитевое средство RNAi по п.1, дополнительно содержащее 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата на 5'-концевом нуклеотиде антисмысловой нити.

6. Двухнитевое средство RNAi по п.1, которое дополнительно содержит миметик 5'-фосфата на 5'-концевом нуклеотиде антисмысловой нити.

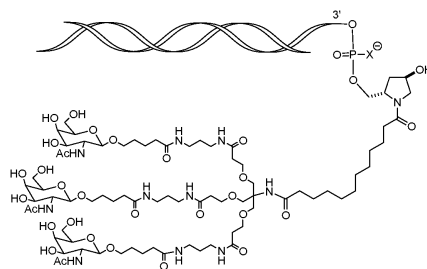
7. Двухнитевое средство RNAi по п.6, где миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфат (5'-VP).

8. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где лиганд представляет собой



9. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити.

10. Двухнитевое средство RNAi по п.9, где средство RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

11. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где антисмысловые нити содержат нуклеотидную последо-

вательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO: 6),  
5'-usCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),  
5'-UfsCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 8) и  
5'-VPusCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 9),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь и

VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

12. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);  
5'-usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO: 6);  
5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);  
5'-usCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7);  
5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);  
5'-UfsCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 8);  
5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и  
5'-VPusCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 9),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь и

VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

13. Двухнитевое средство RNAi по п.12, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и

5'-usCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) А, С, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, С, G или U соответственно и

s представляет собой фосфотиоатную связь.

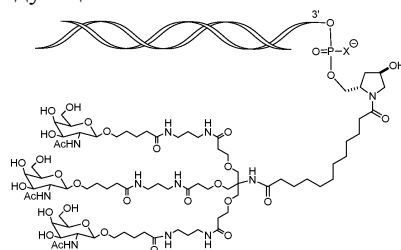
14. Двухнитевое средство RNAi по п.13, где смысловая нить состоит из последовательности нуклеотидов 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и антисмысловая нить состоит из последовательности нуклеотидов 5'-usCfsuugGfuuaAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) А, С, G и U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь,

где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити и где агент РНК-интерференции конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой О.

15. Двухнитевое средство RNAi по п.1, где указанное средство RNAi выбрано из группы средств RNAi, приведенных в любой из табл. 1, 3, 5, 6 или 7.

16. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi) для ингибирования экспрессии транскриптора (TTR) в клетке, где

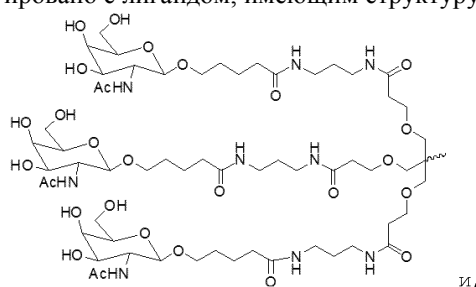
указанное средство RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевый участок,

где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 7),

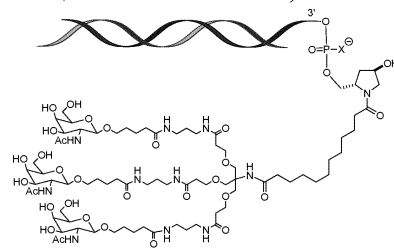
где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) А, С, G и U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U, соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь и где средство RNAi конъюгировано с лигандом, имеющим структуру



где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая двухнитевое средство RNAi по любому из пп.1-16.
18. Фармацевтическая композиция по п.17, содержащая фармацевтически приемлемую соль агента dsRNA.
19. Фармацевтически приемлемая соль агента dsRNA по любому из пп.1-16.
20. Способ ингибирования экспрессии транстиретина (TTR) в клетке, при этом способ предусматривает приведение клетки в контакт с двухнитевым средством RNAi по любому из пп.1-16 или фармацевтической композицией по п.17 или 18.
21. Способ лечения субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженному риску развития ассоциированного с TTR заболевания, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества двухнитевого средства RNAi по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 или 18.
22. Способ снижения, замедления или прекращения повышения балла по шкале оценки невропатических нарушений (NIS) или модифицированной NIS (mNIS+7) у субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества двухнитевого средства RNAi по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 или 18.
23. Способ по п.21 или 22, где субъектом является человек.
24. Способ по п.21 или 22, где указанным субъектом является субъект, страдающий ассоциированным с TTR заболеванием.
25. Способ по п.21 или 22, где указанным субъектом является субъект, подверженный риску развития ассоциированного с TTR заболевания.
26. Способ по п.21 или 22, где указанный субъект имеет мутацию гена TTR, которая ассоциирована с развитием ассоциированного с TTR заболевания.
27. Способ по п.21 или 22, где указанное ассоциированное с TTR заболевание выбрано из группы, состоящей из старческого системного амилоидоза (SSA), системного семейного амилоидоза, семейной амилоидотической полинейропатии (FAP), семейной амилоидотической кардиомиопатии (FAC), лептотенингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС) и гипертироксинемии.
28. Способ по п.21 или 22, где у указанного субъекта имеется ассоциированный с TTR амилоидоз и указанный способ обеспечивает снижение отложения TTR-амилоида у указанного субъекта.
29. Способ по п.21 или 22, где указанное двухнитевое средство RNAi вводят указанному субъекту посредством пути введения, выбранного из группы, состоящей из подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, цереброспинального и любых их комбинаций.
30. Способ по п.21 или 22, где указанное двухнитевое средство RNAi вводят указанному субъекту посредством подкожного, внутримышечного или внутривенного введения.
31. Способ по п.21 или 22, где указанное двухнитевое средство RNAi вводят указанному субъекту посредством подкожного введения.
32. Способ по п.31, где подкожное введение представляет собой самостоятельное введение.
33. Способ по п.32, где самостоятельное введение осуществляют с помощью предварительно запол-



ненного шприца или автоматического медицинского шприца.

34. Способ по п.33, где двухнитевое средство RNAi вводят субъекту в течение длительного времени каждые 4 недели, каждые 5 недель или каждые шесть недель.

35. Способ лечения субъекта, страдающего ассоциированным с TTR заболеванием или подверженного риску развития ассоциированного с TTR заболевания, предусматривающий введение субъекту фиксированной дозы, составляющей от 25 до 50 мг средства на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (RNAi),

где двухнитевое средство RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевый участок,

где указанная смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность UGGGAUUUCAU-GUAACCAAGA-3' (SEQ ID NO: 2) и указанная антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC-3' (SEQ ID NO: 3),

где, по существу, все нуклеотиды смысловой нити и, по существу, все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды,

где смысловая нить содержит не более 8 2'-фтор-модификаций;

где антисмысловая нить содержит не более 6 2'-фтор-модификаций;

где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо содержит две фосфотиоатные связи на 5'-конце;

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом и

где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный линкер.

36. Способ по п.35, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO: 6),

5'-usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

5'-UfsCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 8) и

5'-VPusCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 9),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) A, C, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь и

VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

37. Способ по п.35, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);

5'-usCfsuugguuacaugAfaaucccasusc-3' (SEQ ID NO: 6);

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);

5'-usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7);

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10);

5'-UfsCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 8);

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и

5'-VPusCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 9),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) A, C, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь и

VP представляет собой миметик 5'-фосфата.

38. Способ по п.37, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности

5'-usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10) и

5'-usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-OMe) A, C, G или U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные A, C, G или U соответственно и

s представляет собой фосфотиоатную связь.

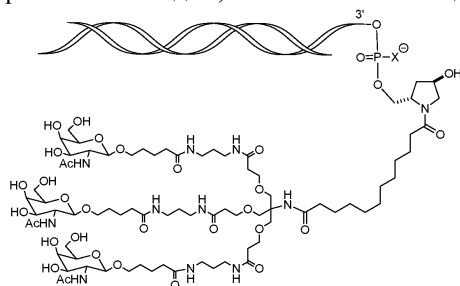
39. Способ по п.38, где смысловая нить состоит из последовательности нуклеотидов usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga-3' (SEQ ID NO: 10), а антисмысловая нить состоит из последовательности нуклеотидов 5'-usCfsuugGfuuAfaugAfaAfucccasusc-3' (SEQ ID NO: 7),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, C, G и U соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U соответственно;

s представляет собой фосфотиоатную связь, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити, и

где средство RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O.

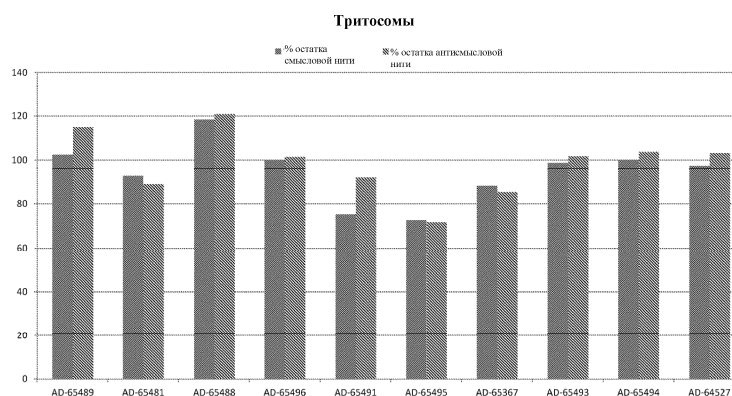
40. Способ по любому из пп.35-39, где двухнитевое средство RNAi вводят субъекту в фиксированной дозе, составляющей 50 мг.

41. Способ по любому из пп.35-39, где двухнитевое средство RNAi вводят субъекту в фиксированной дозе, составляющей 25 мг.

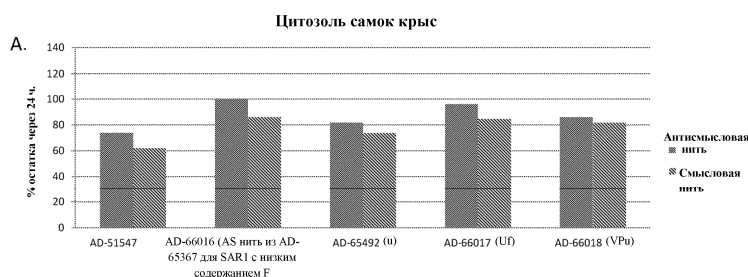
42. Способ по любому из пп.35-41, где фиксированную дозу двухнитевого средства RNAi вводят субъекту один раз каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 8 недель или ежеквартально.

43. Способ по любому из пп.35-41, где фиксированную дозу двухнитевого средства RNAi вводят субъекту один раз ежеквартально.

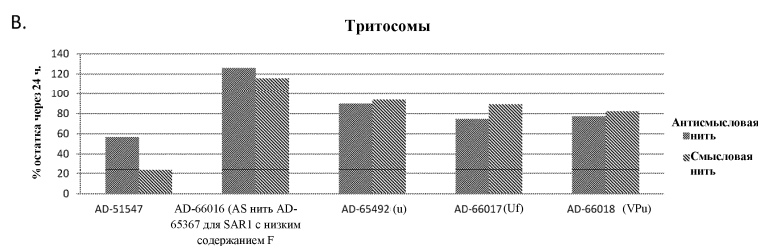
44. Способ по любому из пп.35-43, где указанное ассоциированное с TTR заболевание выбрано из группы, состоящей из старческого системного амилоидоза (SSA), системного семейного амилоидоза, семейной амилоидотической полинейропатии (FAP), семейной амилоидотической кардиомиопатии (FAC), лептоменингеального амилоидоза/амилоидоза центральной нервной системы (ЦНС) и гипертироксинемии.



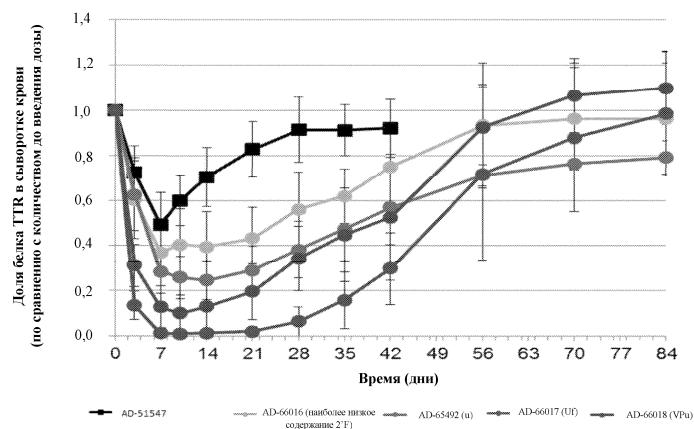
Фиг. 1



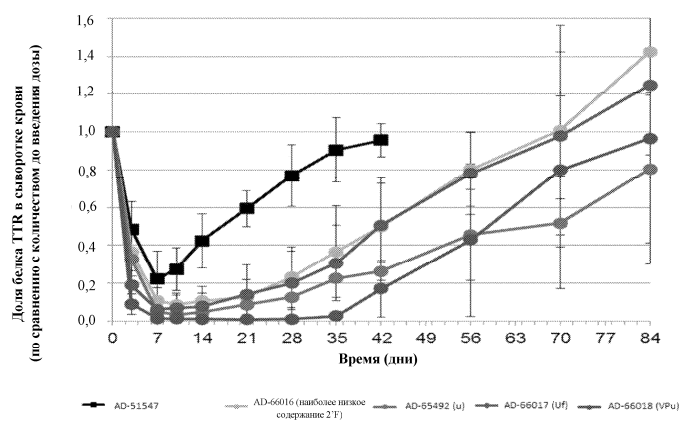
Фиг. 2А



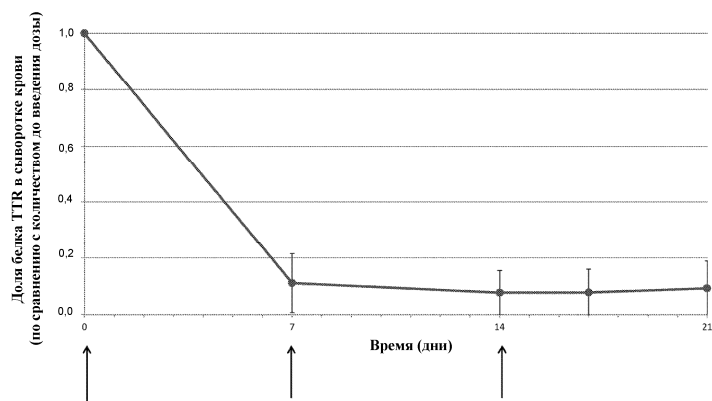
Фиг. 2В



Фиг. 3



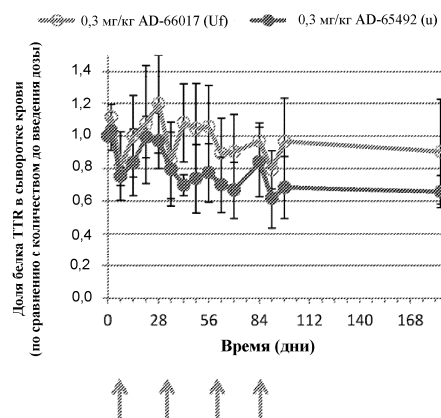
Фиг. 4



Фиг. 5

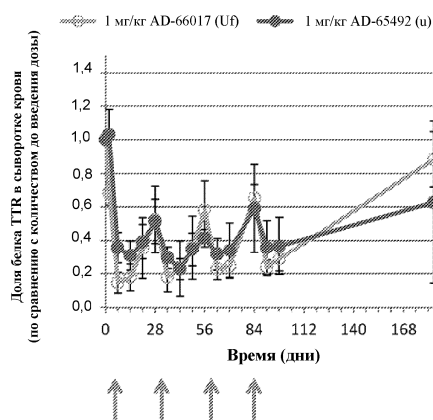
043935

QM×4 в количестве 0,3 мг/кг



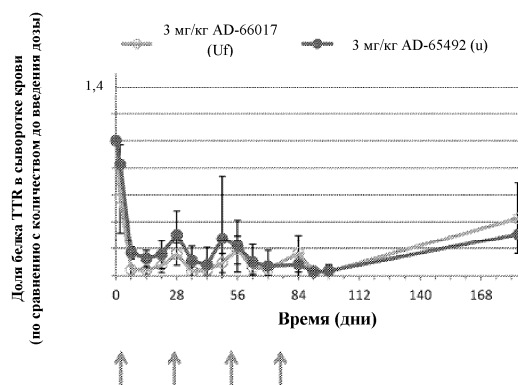
Фиг. 6А

QM×4 в количестве 1 мг/кг



Фиг. 6В

QM×4 в количестве 3 мг/кг



Фиг. 6С

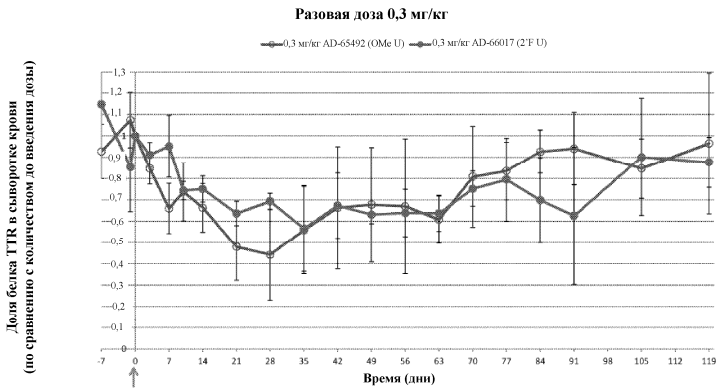
Группы 1-8

Группы 3, 6, 7 и 8 (QMx4)

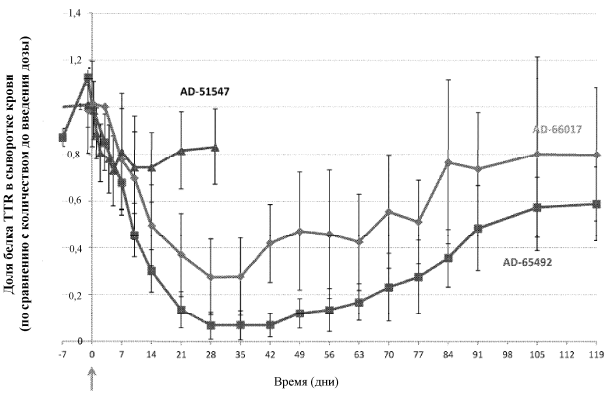
Дни введения дозы: 1295785

| Тестируемый объект | Номер группы | n | День введения дозы | Уровень дозы (мг/кг) | Объем дозы (мл/кг) | Дни повторного введения дозы | Уровень повторной дозы (мг/кг) |
|--------------------|--------------|---|--------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| AD-65492           | 1            | 3 | 1                  | 0,3                  | 2                  | N/A                          | N/A                            |
| AD-65492           | 2            | 3 | 1                  | 1                    | 2                  | N/A                          | N/A                            |
| AD-65492           | 3            | 3 | 1                  | 3                    | 2                  | 29, 57, 85                   | 3                              |
| AD-66017           | 4            | 3 | 1                  | 0,3                  | 2                  | N/A                          | N/A                            |
| AD-66017           | 5            | 3 | 1                  | 1                    | 2                  | N/A                          | N/A                            |
| AD-66017           | 6            | 3 | 1                  | 3                    | 2                  | 29, 57, 85                   | 3                              |
| AD-65492           | 7            | 3 | 1                  | 1                    | 2                  | 29, 57, 85                   | 1                              |
| AD-66017           | 8            | 3 | 1                  | 1                    | 2                  | 29, 57, 85                   | 1                              |

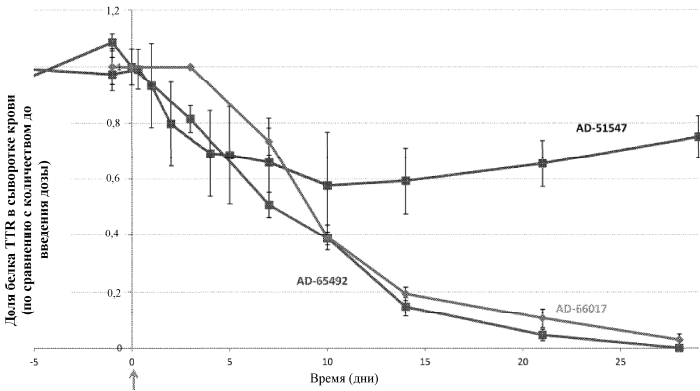
Фиг. 7



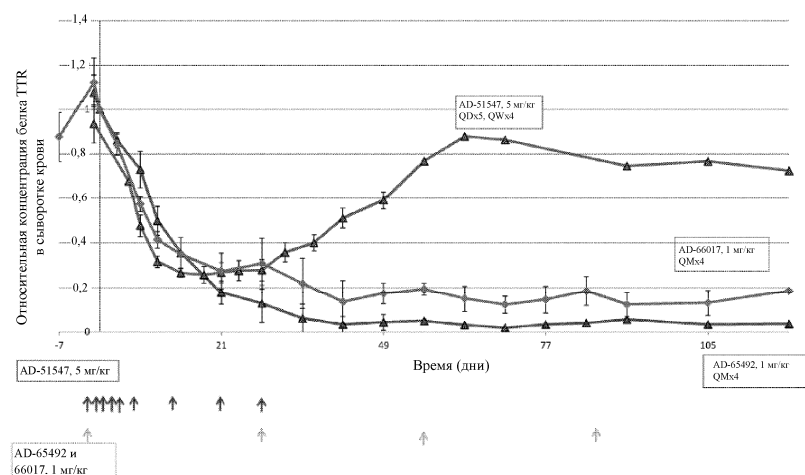
Фиг. 8А



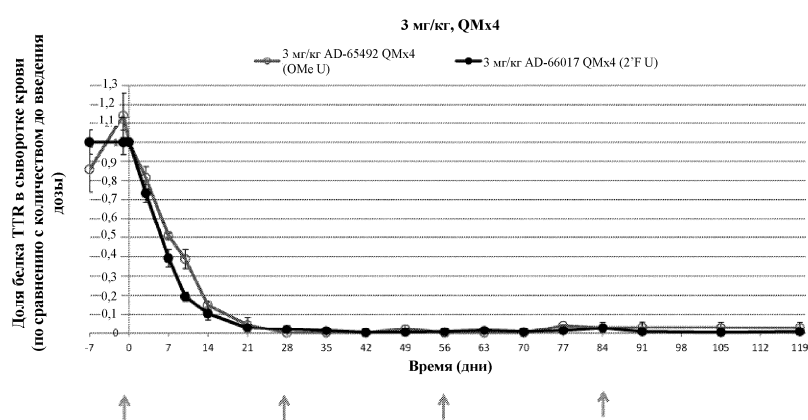
Фиг. 8В



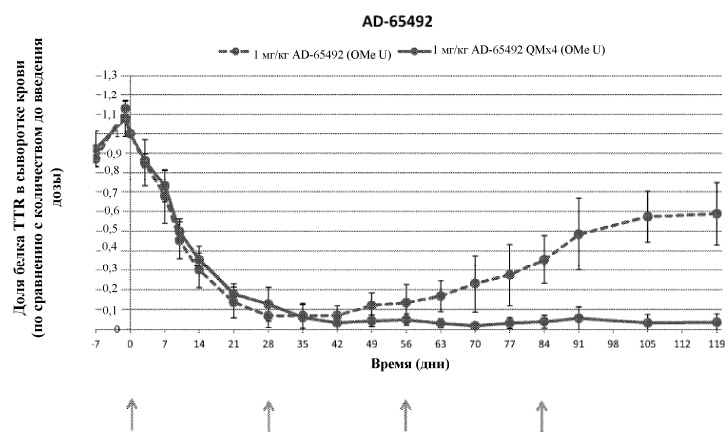
Фиг. 8С



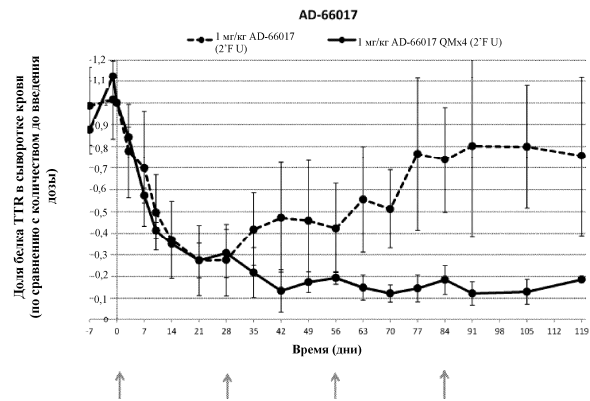
Фиг. 9А



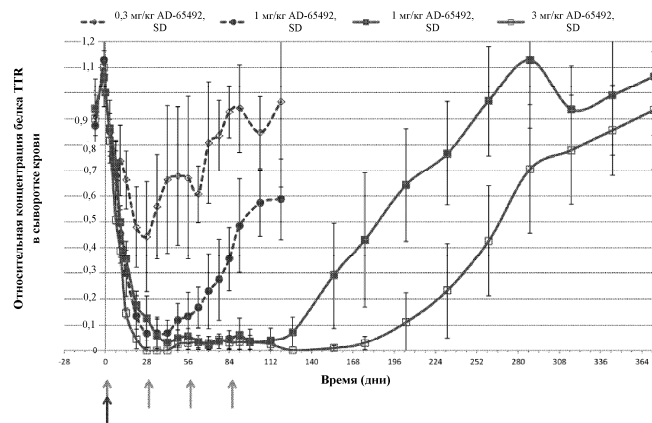
Фиг. 9В



Фиг. 10А



Фиг. 10В

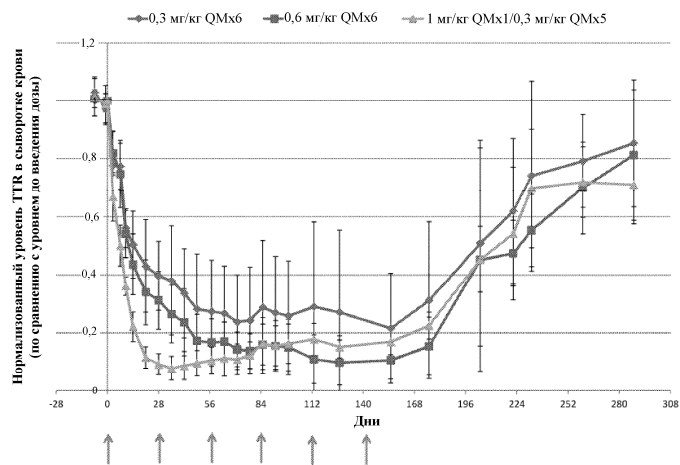


Фиг. 11



| Тестируемый объект | Номер группы | Номер дозы | День введения дозы | Уровень дозы (мг/кг) | Объем дозы (мл/кг) | Дни повторного введения дозы | Уровень повторной дозы (мг/кг) |
|--------------------|--------------|------------|--------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|--------------------------------|
| AD-65492           | 9            | 4          | 1                  | 0,3                  | 2                  | 29, 57, 85, 113, 141         | 0,3                            |
| AD-65492           | 10           | 4          | 1                  | 0,6                  | 2                  | 29, 57, 85, 113, 141         | 0,6                            |
| AD-65492           | 11           | 4          | 1                  | 1                    | 2                  | 29, 57, 85, 113, 141         | 0,3                            |

Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2