

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044209**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.31**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201691587**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.02.11**

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA ДЛЯ КЕТОГЕКСОКИНАЗЫ (КНК) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 61/938,567

**(32)** 2014.02.11

**(33)** US

**(43)** 2017.01.30

**(86)** PCT/US2015/015367

**(87)** WO 2015/123264 2015.08.20

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

**(72)** Изобретатель:  
**Фитцджеральд Кевин, Беттенкорт  
Брайан, Хинкл Грегори, Уиллоуби  
Дженнифер (US)**

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

**(56)** WO-A2-2012019188

P. CIRILLO ET AL.: "Ketoheokinase-Dependent Metabolism of Fructose Induces Proinflammatory Mediators in Proximal Tubular Cells", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 20, no. 3, 25 February 2009 (2009-02-25), pages 545-553, XP055187675, ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2008060576, cited in the application, figure 2

KAY L.H. WU ET AL.: "An increase in adenosine-5'-triphosphate (ATP) content in rostral ventrolateral medulla is engaged in the high fructose diet-induced hyperten", JOURNAL OF BIOMEDICAL SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 21, no. 1, 27 January 2014 (2014-01-27), pages 8-14, XP021175336, ISSN: 1423-0127, DOI:10.1186/1423-0127-21-8, figure 7

---

**(57)** Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген кетогексокиназы (КНК), и способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии КНК, и способам лечения субъектов с нарушением, ассоциированным с КНК, например заболеванием печени (например, жировым перерождением печени, стеатогепатитом), дислипидемией (например, гиперлипидемией, высоким уровнем холестерина LDL, низким уровнем холестерина HDL, гипертриглицеридемией, постпрандиальной гипертриглицеридемией), нарушениями гликемического контроля (например, инсулинорезистентностью, диабетом), сердечно-сосудистым заболеванием (например, гипертензией, дисфункцией эндотелиальных клеток), заболеванием почек (например, острым нарушением функции почек, канальцевой дисфункцией, провоспалительными изменениями проксимальных канальцев), метаболическим синдромом, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением, гиперурикемией, подагрой, расстройством пищевого поведения и чрезмерным пристрастием к сахару.

---

**044209**  
**B1**

**044209**  
**B1**

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ при помощи ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 11 февраля 2015 г., имеет название 121301-01220\_SL.txt, и ее размер составляет 116205 байт.

### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США № 61/938567, поданной 11 февраля 2014 г., полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки.

### Уровень техники

Эпидемиологические исследования показали, что западный рацион является одной из основных причин современной пандемии ожирения. Повышение поглощения глюкозы, ассоциированное с употреблением обогащенных безалкогольных напитков и переработанных продуктов, предположительно является основным фактором, способствующим эпидемии. К 1967 г. подсластители из кукурузы с высоким содержанием фруктозы начали получать широкое применение в пищевой промышленности. Хотя глюкоза и фруктоза обладают одинаковой калорийностью в расчете на одну молекулу, эти два сахара преобразуются в ходе метаболизма неодинаково и используют разные GLUT-транспортеры. Фруктоза преобразуется в ходе метаболизма практически исключительно в печени, и, в отличие от пути метаболизма глюкозы, путь метаболизма фруктозы не регулируется ингибированием продуктом по принципу обратной связи (Khaitan Z et al. (2013) *J. Nutr. Metab.* 2013, ID статьи 682673, 1-12). Тогда как гексокиназа и фосфофруктокиназа (PFK) регулируют выработку глицеральдегида-3-Р из глюкозы, фруктокиназа или кето-гексокиназа (КНК), отвечающие за фосфорилирование фруктозы до фруктозо-1-фосфата в печени, не подвергаются подавлению повышающимися концентрациями фруктозо-1-фосфата. В результате вся фруктоза, поступающая в клетку, быстро фосфорилируется. (Cirillo P. et al. (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 545-553). Длительное использование АТФ для фосфорилирования фруктозы до фруктозо-1-фосфата приводит к истощению запасов внутриклеточного фосфата, истощению запасов АТФ, активации АМР-дезаминазы и образованию мочевой кислоты (Khaitan Z. et al. (2013) *J. Nutr. Metab.* ID статьи 682673, 1-12). Повышение уровня мочевой кислоты дополнительно стимулирует активацию КНК (Lanaspa M.A. et al. (2012) *PLOS ONE* 7(10): 1-11) и вызывает дисфункцию эндотелиальных клеток и адипоцитов. Фруктозо-1-фосфат затем превращается в глицеральдегид под действием альдолазы В и фосфорилируется до глицеральдегид-3-фосфата. Последний направляется далее в путь гликолиза с образованием пирувата, который поступает в цикл трикарбоновых кислот, откуда в условиях хорошего питания цитрат экспортируется в цитозоль из митохондрий, давая начало ацетилкоферменту А для липогенеза (фиг. 1).

Фосфорилирование фруктозы с помощью КНК и последующая активация липогенеза приводят, например, к жировому перерождению печени, гипертриглицеридемии, дислипидемии и инсулинорезистентности. Также было показано, что провоспалительные изменения в клетках проксимальных канальцев почек индуцируются активностью КНК (Cirillo P. et al. (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.* 20: 545-553). Фосфорилирование фруктозы с помощью КНК ассоциировано с такими заболеваниями, нарушениями и/или состояниями, как заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару. Соответственно, в данной области техники существует необходимость в композициях и способах для лечения заболеваний, нарушений и/или состояний, ассоциированных с активностью КНК.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, нацеленные на кетогексокиназу (КНК). Настоящее изобретение также предусматривает способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии КНК и/или для лечения субъекта с нарушением, на которое ингибирование или снижение экспрессии гена КНК будет оказывать благоприятное воздействие, например, заболеванием, ассоциированным с КНК, таким как заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК), содержащее смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК), содержащее смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, 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, приведенных в любой из табл. 3-5.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из AD-63851, AD-63820, AD-63853, AD-63839, AD-63854, AD-63855 и AD-63886 и любой из последовательностей, раскрытых в любой из табл. 3, 4, 8, 11, 12, 14 и 15.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, "запертого" нуклеотида, "незапертого" нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида, лишённого азотистого основания, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК), которые содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами.

В другом варианте осуществления смысловая нить и антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-7.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфоротиоатную группу, дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, "запертого" нуклеотида, "незапертого" нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида, лишённого азотистого основания, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифици-

рованного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

В другом варианте осуществления двухнитевого средства для RNAi по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В еще одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит лиганд. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят с применением фармацевтической композиции и липидного состава. В другом варианте осуществления липидный состав включает липидную наночастицу (LNP). В еще одном варианте осуществления липидная наночастица (LNP) содержит липид МСЗ.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает композицию, содержащую средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида, где средство способно ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке и содержит последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-5, где полинуклеотид имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевое средство для RNAi, способное ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (III)

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  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый  $p, p', q$  и  $q'$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации  $Y$ , а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$  и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

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

В одном варианте осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y' и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

В другом варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $Y'$  представляет собой 2'-О-метил.

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая:  $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIa).

В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая:  $5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p -N_a' - Y'Y'Y' -N_b' -Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIb)

где каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В еще одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая:  $5' n_p -N_a -X X X -N_b -Y Y Y -N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p -N_a' - X'X'X' -N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIc)

где каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В дополнительном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIд):

смысловая:  $5' n_p -N_a -X X X - N_b -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3'$

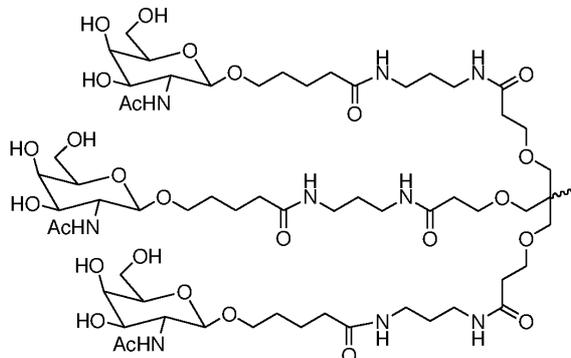
антисмысловая:  $3' n_p -N_a' - X'X'X' - N_b' -Y'Y'Y' -N_b' -Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$  (IIIд)

где каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, а каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

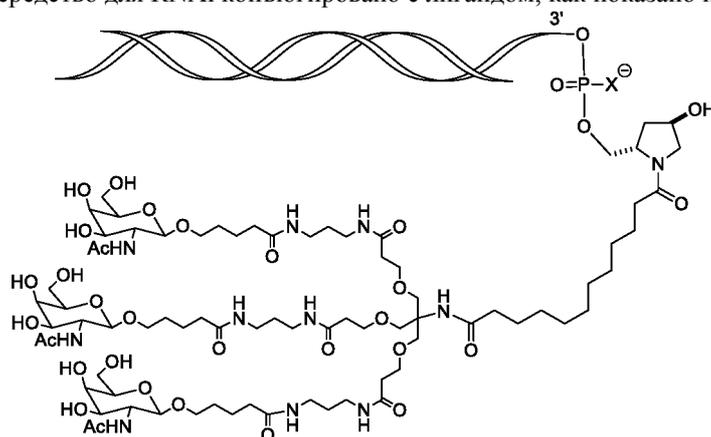
В одном варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 15-30 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 17-23 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 17-25 пар нуклеотидов. В дополнительном варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 23-27 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 19-21 пара нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 19-23 пары нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухнитевой участок имеет длину 21-23 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксиде, 2'-гидроксила и их комбинаций. В другом варианте осуществления модификации нуклеотидов являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями.

В одном варианте осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В другом варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити. В другом варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S. В конкретном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В дополнительном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити. В другом варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити. В другом варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В дополнительном варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити. В другом варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить.

В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В дополнительном варианте осуществления антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В одном варианте осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой нити дуплекса является парой оснований AU. В другом варианте осуществления нуклеотиды Y имеют 2'-фтор-модификацию. В дополнительном варианте осуществления нуклеотиды Y' имеют 2'-O-метил-модификацию.

В одном варианте осуществления  $p' > 0$ . В другом варианте осуществления  $p' = 2$ . В дополнительном варианте осуществления  $q' = 0$ ,  $p = 0$ ,  $q = 0$ , а выступающие нуклеотиды  $p'$  являются комплементарными целевой mRNA. В еще одном варианте осуществления  $q' = 0$ ,  $p = 0$ ,  $q = 0$ , а выступающие нуклеотиды  $p'$  не являются комплементарными целевой mRNA.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

В другом варианте осуществления по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. В дополнительном варианте осуществления все  $n_p'$  связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфоротиоатных связей.

В другом варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, приведенных в любой из табл. 3-5.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает двухнитевые средства для RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК). Двухнитевые средства для RNAi содержат смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевый участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию КНК (кетогексокиназы) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (III)

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  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содер-

жащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y, а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации Y';

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (III)

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

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

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

$n_p' > 0$ , при этом по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y, а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации Y';

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевое средство для RNAi, способное ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

антисмысловая:  $3' n_p' - N_a' - (X'X'X')_k - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - (Z'Z'Z')_l - N_a' - n_q' 5'$  (III)

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

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

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

$n_p' > 0$ , при этом по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два неодинаково модифицированных нуклеотида;

каждый  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

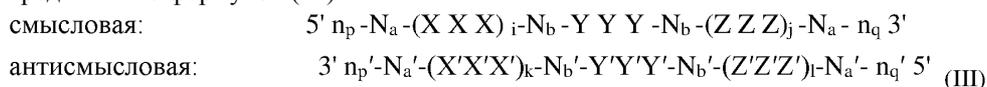
жащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации N<sub>b</sub> отличаются от модификации Y, а модификации N<sub>b</sub>' отличаются от модификации Y';

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



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

каждый из n<sub>p</sub>, n<sub>q</sub> и n<sub>q</sub>', каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

n<sub>p</sub>' > 0, при этом по меньшей мере один n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

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

каждый N<sub>b</sub> и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

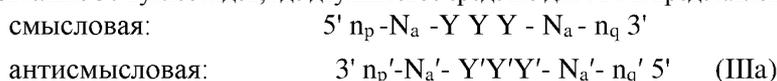
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации N<sub>b</sub> отличаются от модификации Y, а модификации N<sub>b</sub>' отличаются от модификации Y';

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В еще одном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухнитевое средство для RNAi, способное ингибировать экспрессию кетогексокиназы (КНК) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части mRNA, кодирующей КНК, где каждая нить имеет длину от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):



где каждый из n<sub>p</sub>, n<sub>q</sub> и n<sub>q</sub>', каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

n<sub>p</sub>' > 0, при этом по меньшей мере один n<sub>p</sub>' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи;

каждый N<sub>a</sub> и N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо 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 трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Настоящее изобретение также предусматривает клетки, векторы, клетки-хозяева и фармацевтические композиции, содержащие двухнитевые средства для RNAi согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает двухнитевые средства для RNAi, включающие средства для RNAi, приведенные в любой из табл. 3-7.

В одном варианте осуществления клетка содержит двухнитевое средство для RNAi.

В другом варианте осуществления вектор кодирует по меньшей мере одну нить двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит участок комплементарности по меньшей мере к части mRNA, кодирующей кетогексокиназу, где двухнитевое средство для RNAi имеет длину 30 пар оснований или менее, и где двухнитевое средство для RNAi нацеливается на mRNA для расщепления. В дополнительном варианте осуществления участок комплементарности имеет длину по меньшей мере 15 нуклеотидов. В другом варианте осуществления участок комплементарности имеет длину 19-21 нуклеотид. В другом варианте осуществления клетка содержит вектор.

В некоторых вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi или композицию, содержащую средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида, вводят с применением фармацевтической композиции.

В предпочтительных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в растворе. В некоторых вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в небуферном растворе. В другом варианте осуществления небуферный раствор представляет собой физиологический раствор или воду. В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят с буферным раствором. В еще одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi, фармацевтической композицией, композицией, содержащей средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида, или вектором, содержащим средство для RNAi, и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения mRNA-транскрипта гена КНК, ингибируя, таким образом, экспрессию гена КНК в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте. В дополнительном варианте осуществления субъектом является человек. В дополнительном варианте осуществления субъект страдает от заболевания, ассоциированного с кетогексокиназой.

В одном варианте осуществления экспрессию КНК ингибируют по меньшей мере приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95%, приблизительно на 98% или приблизительно на 100%.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с кетогексокиназой (КНК), включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, композиции, содержащей средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида, или фармацевтической композиции, содержащей двухнитевое средство для RNAi, осуществляя, таким образом, лечение субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с кетогексокиназой (КНК), которые включают подкожное введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 5, а антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, где практически все нуклеотиды смысловой нити имеют модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити имеют модификацию.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с кетогексокиназой, выбрано из группы, состоящей из заболевания печени, дислипидемии, нарушений гликемического контроля, сердечно-сосудистого заболевания, заболевания почек, метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерного пристрастия к сахару. В конкретном варианте осуществления заболевание печени представляет собой жировое перерождение печени и/или стеатогепатит. В другом варианте осуществления дислипидемия выбрана из группы, состоящей из гиперлипидемии, высокого уровня холестерина LDL, низкого уровня холестерина HDL, гипертриглицеридемии и постпрандиальной гипертриглицеридемии. В еще одном варианте осуществления нарушение гликемического контроля представляет собой инсулинорезистентность и/или диабет. В дополнительном варианте осуществления сердечно-сосудистое заболевание представляет собой гипертензию и/или дисфункцию эндотелиальных клеток. В еще одном варианте осуществления заболевание почек выбрано из группы, состоящей из острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции и провоспалительных изменений проксимальных канальцев.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В предпочтительном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг или приблизительно 3,0 мг/кг. В конкретном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами.

В еще одном варианте осуществления способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора HMG-CoA-редуктазы, средства для терапии диабета, гипотензивного лекарственного средства и ресвератрола.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показан метаболизм фруктозы под действием кетогексокиназы и метаболизм глюкозы и фруктозы под действием гексокиназы.

На фиг. 2 показан порядок расположения экзонов в гене КНК человека для продуктов-транскриптов кетогексокиназы А (NM\_000221.2), кетогексокиназы С (NM\_006488.2) и варианта транскрипта X5 (XM\_005264298.1).

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например, средства на основе двухнитевой iRNA, нацеленные на КНК. Настоящее изобретение также предусматривает способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии КНК и для лечения заболевания, нарушений и/или состояний, ассоциированных с КНК, например, заболевания печени (например, жирового перерождения печени, стеатогепатита), дислипидемии (например, гиперлипидемии, высокого уровня холестерина LDL, низкого уровня холестерина HDL, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета), сердечно-сосудистого заболевания (например, гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерного пристрастия к сахару (Khaitan Z. et al. (2013) *J. Nutr. Metab.*, ID статьи 682673, 1-12; Diggle C.P. et al. (2009) *J. Histochem. Cytochem.*, 57(8): 763-774; Cirillo P. et al. (2009) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20: 545-553; Lanaspá M.A. et al. (2012) *PLOS ONE* 7(10): 1-11).

Ген КНК (кетогексокиназы) расположен на хромосоме 2p23 и кодирует кетогексокиназу, также известную как фруктокиназа. КНК является ферментом фосфотрансферазой, при этом в качестве акцептора фосфата выступает спирт. КНК принадлежит к карбогидраткиназам семейства рибокиназ (Trinh et al., *ACTACryst*, D65: 201-211). Были идентифицированы две изоформы кетогексокиназы, КНК-А и КНК-С, получаемые в результате альтернативного сплайсинга mRNA полной длины. Эти изоформы отличаются включением экзона 3a либо 3c и отличаются 32 аминокислотами между положениями 72 и 115 (см., например, фиг. 2). mRNA КНК-С экспрессируется на высоких уровнях, преимущественно в печени, почке и тонкой кишке. КНК-С характеризуется намного более низкой  $K_m$  для связывания с фруктозой, чем КНК-А, и вследствие этого является высокоэффективной в фосфорилировании пищевой фруктозы. Последовательность mRNA-транскрипта КНК-С человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:153218447 (NM\_006488.2; SEQ ID NO: 1). Последовательность mRNA-транскрипта КНК-А человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:153218446 (NM\_000221.2; SEQ ID NO: 3). Применяли последовательность mRNA КНК человека полной длины, представленную под № доступа в GenBank GI:530367552 (XM\_005264298.1; SEQ ID NO: 5) (фиг. 2).

Настоящее изобретение предусматривает средства на основе iRNA, композиции и способы модули-

рования экспрессии гена КНК. В определенных вариантах осуществления экспрессию КНК снижают или ингибируют с применением специфичного для КНК средства на основе iRNA, что, таким образом, приводит к снижению фосфорилирования фруктозы до фруктозо-1-фосфата и, таким образом, к предупреждению повышения уровней мочевой кислоты и усиления липогенеза. Таким образом, ингибирование экспрессии или активности гена КНК с применением композиций на основе iRNA согласно настоящему изобретению применимо в качестве терапии для снижения липогенных эффектов пищевой фруктозы и предупреждения сопутствующего накопления мочевой кислоты у субъекта. Такое ингибирование применимо для лечения таких заболеваний, нарушений и/или состояний, как заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару.

#### I. Определения.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было более легко понять, вначале даны определения некоторым выражениям. 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 статьи. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

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

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

Как используется в данном документе, "КНК" относится к кетогексокиназному гену или белку. КНК также известна как фруктокиназа. Выражение "КНК" включает КНК человека, аминокислотную и полную кодирующую последовательность для которой можно найти, например, под № доступа в GenBank BC006233. Последовательность mRNA-транскрипта КНК-С человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:153218447 (NM\_006488.2; SEQ ID NO: 1). Последовательность, обратная комплементарная SEQ ID NO: 1, представлена под SEQ ID NO: 2. Последовательность mRNA-транскрипта КНК-А человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:153218446 (NM\_000221.2; SEQ ID NO: 3). Последовательность, обратная комплементарная SEQ ID NO: 3, представлена под SEQ ID NO: 4. Последовательность mRNA-транскрипта КНК человека полной длины представлена под № доступа в GenBank GI:530367552 (XM\_005264298.1; SEQ ID NO: 5). Последовательность, обратная комплементарная SEQ ID NO: 5, представлена под SEQ ID NO: 6. Последовательность mRNA КНК мыши (*Mus musculus*) можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:118130797 (NM\_008439.3; SEQ ID NO: 7), а обратная комплементарная последовательность представлена под SEQ ID NO: 8. Последовательность mRNA КНК крысы (*Rattus rattovorus*) можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:126432547 (NM\_031855.3; SEQ ID NO: 9), а ее обратная комплементарная последовательность представлена под SEQ ID NO: 10. Последовательность варианта X1 mRNA КНК макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*) можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:544482340 (XM\_005576321.1; SEQ ID NO: 11) или GI, а ее обратная комплементарная последовательность представлена под SEQ ID NO: 12. Последовательность варианта X3 mRNA КНК макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*) можно найти, например, под № доступа в GenBank GI:544482340 (XM\_005576321.1; SEQ ID NO: 325) или GI, а ее обратная комплементарная последовательность представлена под SEQ ID NO: 326. Дополнительные примеры последовательностей mRNA КНК легкодоступны при использовании общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt, OMIM, и веб-сайта проекта по расшифровке генома Макаса.

Как используется в данном документе, "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной в процессе транскрипции гена КНК, в том числе к mRNA, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Как используется в данном документе, "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы mRNA, образованной в процессе транскрипции гена КНК, в том числе к mRNA, 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 mRNA, образованной в процессе транскрипции гена КНК.

Целевая последовательность может иметь длину приблизительно 9-36 нуклеотидов, например,

иметь длину приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, целевая последовательность может иметь длину 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. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Используемое в данном документе выражение "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, означает нуклеотид, который соответственно содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания. Однако, будет понятно, что выражение "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 спаривания 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 mRNA. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Выражения "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции" или "малая ингибирующая РНК" или "siRNA", используемые в данном документе взаимозаменяемо, означают средство, которое содержит РНК в том значении, в котором это выражение определено в данном документе, и которое опосредует нацеленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфичным в отношении последовательности разрушением mRNA посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию КНК в клетке, например в клетке в субъекте, таком как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению включает однонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью mRNA КНК, управляя расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрушается до siRNA эндонуклеазой III типа, известной как 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'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al. (2001) Nature 409:363). siRNA затем включаются 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 mRNA 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 однонитевой РНК (siRNA), образованной внутри клетки, которая способствует образованию комплекса RISC для осуществления сайленсинга целевого гена, т.е. гена КНК. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для обозначения iRNA, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство на основе iRNA может представлять собой однонитевую siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой mRNA. Однонитевые средства на основе iRNA связываются с эндонуклеазой RISC Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую mRNA. Однонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Конструирование и тестирование однонитевых 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 при помощи ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно применять в качестве однонитевой siRNA, которая описана в данном документе или которая химически 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 согласно настоящему изобретению является двухнитевой РНК, и в данном документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Выражение "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. гену КНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) инициирует разрушение целевой РНК, например, mRNA, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, называемого в данном документе РНК-интерференцией, или RNAi, или iRNA.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе они могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемое в данном описании "средство на основе iRNA" может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство на основе iRNA может иметь значительные модификации нескольких нуклеотидов.

Используемое в данном документе выражение "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 согласно настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, которые применяются в молекуле типа siRNA, охвачены выражением "средство для RNAi" в контексте данных описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может иметь любую длину, которая позволяет осуществлять специфическое разрушение желаемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, и может варьировать по длине в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, иметь длину приблизительно 15-30 пар оснований, например, иметь длину 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, длину 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. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут являться различными частями одной большей молекулы РНК или они могут являться отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две нити являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительную цепь РНК называют "петлей шпильки". Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля шпильки 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 более неспаренных 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, когда две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединительную структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых выступов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры, iRNA может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

Используемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступ" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выдается 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 выступ. dsRNA может содержать выступ, состоящий по меньшей мере из одного нуклеотида; в качестве альтернативы, выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида,

по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступ может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступ(выступы) может(могут) находиться в смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступа может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой либо смысловой нити dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая 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 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 выступа заменены нуклеозидтиофосфатом.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означает, что на этом конце двухнитевого средства на основе iRNA нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство на основе iRNA "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей своей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на каком-либо конце молекулы. Средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению включают средства на основе iRNA с нуклеотидными выступами на одном конце (т.е. средства с одним выступающим и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Выражение "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити iRNA, например, dsRNA, которая содержит участок, практически комплементарный целевой последовательности, например, mRNA КНК. Используемое в данном документе выражение "участок комплементарности" относится к участку на антисмысловой нити, практически комплементарному последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности КНК, 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 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца iRNA.

Выражение "смысловая нить" или "сопровождающая нить", используемое в данном документе, относится к нити iRNA, которая содержит участок, практически комплементарный участку антисмысловой нити, в том значении, в котором это выражение определено в данном документе.

Используемое в данном документе выражение "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом 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 расщепление сайта, в частности, происходит на сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Используемое в данном документе выражение "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 при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C 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 применять 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 последовательностей. 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, 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 с сохранением при этом способности к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибирования

нию экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако, если два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько однонитевых выступов, то такие выступы не будут считаться ошибками спаривания применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид с длиной в 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид с длиной в 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, как используется в данном документе, могут также содержать неутсон-криковские пары оснований и/или пары оснований, образованные из не встречающихся в природе и модифицированных нуклеотидов, или могут быть полностью образованы из них в той мере, в которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности к гибридизации. Такие неутсон-криковские пары оснований включают, без ограничения, неоднозначные G:U или хугстиновские пары оснований.

Выражения "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, как будет понятно из контекста их применения.

Как используется в данном документе, полинуклеотид, "практически комплементарный по меньшей мере части" матричной РНК (mRNA), относится к полинуклеотиду, практически комплементарному смежной части mRNA, представляющей интерес (например, mRNA, кодирующей КНК). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части mRNA КНК, если последовательность практически комплементарна непрерывающейся части mRNA, кодирующей КНК.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе они могут также содержать 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 включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле iRNA, охвачены выражением "iRNA" в контексте данных описания и формулы изобретения.

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

Выражение "ингибирование", используемое в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "подавлением", "супрессией" и другими подобными выражениями, и оно включает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии КНК", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена КНК (такого как, например, ген КНК мыши, ген КНК крысы, ген КНК обезьяны или ген КНК человека), а также вариантов или мутантных форм гена КНК, кодирующего белок КНК.

"Ингибирование экспрессии гена КНК" включает любой уровень ингибирования гена КНК, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена КНК, такую как ингибирование по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Экспрессию гена КНК можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, связанной с экс-

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

В одном варианте осуществления по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена КНК оценивают по снижению количества mRNA КНК, которую можно выделить из первой клетки или группы клеток или выявить в первой клетке или группе клеток, в которой транскрибируется ген КНК и которая была обработана таким образом, что экспрессия гена КНК ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, практически идентичной первой клетке или группе клеток, но которая не была обработана подобным образом (контрольные клетки). Степень ингибирования можно выразить в виде

$$\frac{(\text{mRNA в контрольных клетках}) - (\text{mRNA в обработанных клетках})}{(\text{mRNA в контрольных клетках})} * 100\%$$

Фраза "приведение клетки в контакт со средством на основе iRNA", таким как dsRNA, используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт со средством на основе iRNA включает приведение клетки в контакт с iRNA *in vitro* или приведение клетки в контакт с iRNA *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi может приводиться в физический контакт с клеткой индивидуумом, осуществляющим способ, или, в качестве альтернативы, средство на основе iRNA можно поместить в обстановку, которая позволит средству впоследствии прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством на основе iRNA. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства на основе iRNA в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией средства на основе iRNA в другую область, например, в кровоток или подкожное пространство, так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт. Например, средство на основе iRNA может содержать лиганд, например, GalNAc3, который направляет средство на основе iRNA к месту, представляющему интерес, например, к печени, и/или может быть соединено с ним. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт со средством на основе iRNA *in vitro* и впоследствии трансплантировать субъекту.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с iRNA включает "введение" или "доставку iRNA в клетку" путем стимуляции или осуществления поглощения или абсорбции в клетку. Абсорбция или поглощение iRNA может происходить посредством самостоятельных диффузионных или активных клеточных процессов или при помощи вспомогательных средств или устройств. Введение iRNA в клетку можно осуществлять *in vitro* и/или *in vivo*. Например, в случае введения *in vivo* iRNA можно вводить инъекцией в определенный участок ткани или вводить системно.

Доставку *in vivo* также можно осуществлять с помощью системы доставки на основе бета-глюкана, такой как описанная в патентах США №№ 5032401 и 5607677 и публикации патента США № 2005/0281781, полное содержание которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки. Введение в клетку *in vitro* включает известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже и/или известны из уровня техники.

Выражение "липидная наночастица" или "LNP" означает везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, iRNA или плазида, с которой транскрибируется iRNA. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Как используется в данном документе, "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, в том числе примат (такой как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), отличное от примата животное (такое как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птица (например, утка или гусь). В варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, получающий лечение или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения и/или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии КНК; человек, подверженный риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии кетогексокиназы; человек с заболеванием, нарушением или состоянием, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии кетогексокиназы.

Как используется в данном документе, выражения "осуществление лечения" или "лечение" отно-

ся к благоприятному или желаемому результату, включающему, без ограничения, облегчение или уменьшение интенсивности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нежелательной активацией кетогексокиназы (например, заболевания печени (например, жирового перерождения печени, стеатогепатита), дислипидемии (например, гиперлипидемии, высокого уровня холестерина LDL, низкого уровня холестерина HDL, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушений гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабета), сердечно-сосудистого заболевания (например, гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболевания почек (например, острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительных изменений проксимальных канальцев), метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерного пристрастия к сахару); стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) одного или нескольких заболеваний, нарушений и/или состояний, ассоциированных с активностью кетогексокиназы; уменьшение интенсивности или временное ослабление нежелательной активности кетогексокиназы (например, фосфорилирования фруктозы, приводящего к активации липогенеза и повышению выработки мочевой кислоты), независимо от того, является ли он выявляемым или невыявляемым. "Лечение" также может означать продление срока выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Следовательно, ослабление или уменьшение интенсивности любого из симптомов, обусловленных метаболизмом фруктозы посредством пути с участием КНК, включает ослабление или уменьшение интенсивности любого одного или нескольких симптомов, включающих, без ограничения, группу, включающую жировое перерождение печени, стеатогепатит, высокое кровяное давление, гипертензию, высокий уровень холестерина, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гиперлипидемию, гипертриглицеридемию, заболевание почек, метаболический синдром, чрезмерное пристрастие к сахару, расстройство пищевого поведения, постпрандиальную гипертриглицеридемию, гепатостеатоз, подагру, диабет, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, инсулинорезистентность и ожирение. В некоторых вариантах осуществления ослабление или уменьшение интенсивности заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с КНК, означает ослабление проявления гепатостеатоза, избытка телесного жира, ожирения, высокого уровня холестерина, гипертензии или высокого кровяного давления.

Выражение "более низкий" применительно к уровню активности кетогексокиназы у субъекта или в качестве маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более, и предпочтительно до уровня, принятого в качестве находящегося в диапазоне нормальных значений для индивидуума без такого нарушения.

Как используется в данном документе, "предупреждение" или "осуществление предупреждения", применяемое в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена КНК, относится к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом фосфорилирования фруктозы до фруктозо-1-фосфата, как, например, активации липогенеза и повышения выработки мочевой кислоты, что приводит, например, к заболеванию печени (например, жировому перерождению печени, стеатогепатиту), дислипидемии (например, гиперлипидемии, высокому уровню холестерина LDL, низкому уровню холестерина HDL, гипертриглицеридемии, постпрандиальной гипертриглицеридемии), нарушениям гликемического контроля (например, инсулинорезистентности, диабету), сердечно-сосудистому заболеванию (например, гипертензии, дисфункции эндотелиальных клеток), заболеванию почек (например, острому нарушению функции почек, канальцевой дисфункции, провоспалительным изменениям проксимальных канальцев), метаболическому синдрому, дисфункции адипоцитов, отложению висцерального жира, ожирению, гиперурикемии, подагре, расстройствам пищевого поведения и чрезмерному пристрастию к сахару. Вероятность развития любого из этих заболеваний, нарушений и/или состояний или их всех снижается, например, если у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска любого из этих заболеваний, нарушений и/или состояний или их всех, неспособно развиться заболевание, нарушение и/или состояние или развивается заболевание, нарушение и/или состояние с меньшей тяжестью по сравнению с популяцией, имеющей те же самые факторы риска и не получающей лечение, описанное в данном документе. Неспособность к развитию заболевания, нарушения и/или состояния, или ослабление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением и/или состоянием (например, по меньшей мере приблизительно на 10% по принятой в клинической практике шкале для этого заболевания или нарушения), или отсрочивание проявления симптомов (отсрочивание, например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считается эффективным предупреждением.

Используемое в данном документе выражение "заболевание, ассоциированное с кетогексокиназой" означает заболевание, нарушение или состояние, обусловленное кетогексокиназным геном или белком или ассоциированное с ним, например, заболевание, нарушение или состояние, обусловленное фосфори-

лированием фруктозы до фруктозо-1-фосфата или ассоциированное с ним. Такие заболевания обычно ассоциированы с активацией липогенеза и повышением выработки мочевой кислоты. Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с кетогексокиназой, включают заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемию (например, гиперлипидемию, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункцию адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемию, подагру, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару.

"Терапевтически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевают как включающее количество средства на основе iRNA, которое при введении субъекту, имеющему заболевание, ассоциированное с КНК, является достаточным для осуществления лечения заболевания или нарушения (например, путем ослабления или уменьшения интенсивности заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей субъекта, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", как используется в данном документе, подразумевают как включающее количество средства на основе iRNA, которое при введении субъекту, имеющему заболевание, ассоциированное с КНК, но еще (или на данный момент) не испытывающему или не проявляющему симптомы заболевания, и/или субъекту, имеющему риск развития заболевания, ассоциированного с КНК, например, заболевания печени, дислипидемии, нарушения гликемического контроля, сердечно-сосудистого заболевания, заболевания почек, метаболического синдрома и/или ожирения, является достаточным для предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Уменьшение интенсивности заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания, развивающегося позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства на основе iRNA, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включают количество средства для RNAi, которое обеспечивает некоторый требуемый местный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Средства на основе iRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для обеспечения приемлемого соотношения польза/риск, применимого к такому лечению. Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Фраза "фармацевтически приемлемый носитель", используемая в данном документе, означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, добавку для производства (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред субъекту, подвергаемому лечению. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидри-

ды; (22) объемобразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты, (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Выражение "образец", используемое в данном документе, предусматривает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в субъекте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, мочу, лимфу, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, слюну и т.п. 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 можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму крови, взятые у субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени (или ее составляющие), полученную от субъекта.

## II. iRNA согласно изобретению.

Настоящее изобретение также предусматривает iRNA, которые ингибируют экспрессию гена КНК. В одном варианте осуществления средство на основе iRNA включает в себя молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена КНК в клетке, такой как клетке в субъекте, например, млекопитающем, таком как человек с заболеванием или нарушением, ассоциированным с КНК, включающим, без ограничения, заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемию (например, гиперлипидемию, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункцию адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемию, подагру, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару. dsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности для по меньшей мере части mRNA, образующейся при экспрессии гена КНК. Участок комплементарности имеет длину приблизительно 30 нуклеотидов или менее (например, имеет длину приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или менее). При контакте с клеткой, экспрессирующей ген КНК, iRNA ингибирует экспрессию гена КНК (например, гена КНК человека, примата, отличного от примата животного или птицы) по меньшей мере приблизительно на 10% согласно анализу, например, с помощью 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 практически комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности mRNA, образующейся в процессе экспрессии гена КНК. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити таким образом, что две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении при подходящих условиях. Как описано в другом месте в данном документе и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, имеет длину 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. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично, участок комплементарности для целевой последовательности имеет длину от 15 до 30 нуклеотидов, например, имеет длину

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. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазо-  
 нам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления dsRNA имеет длину от приблизительно 15 до приблизи-  
 тельно 20 нуклеотидов или имеет длину 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 техники, dsRNA с длиной более чем приблизительно  
 21-23 нуклеотида могут служить субстратами для Dicer. Как также будет понятно обычному специали-  
 сту, участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной моле-  
 кулы РНК, зачастую молекулы mRNA. В соответствующих случаях "частью" целевой mRNA является  
 смежная последовательность целевой mRNA, имеющая длину, достаточную для того, чтобы позволить  
 ей быть субстратом для управляемого iRNA расщепления (т.е. расщепления посредством пути с участи-  
 ем 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, 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 ста-  
 новятся процессированными до функционального дуплекса из, например, 15-30 пар оснований, который  
 нацеливается на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие  
 дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом,  
 обычному специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA  
 представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречаю-  
 щуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, пригодное для  
 целенаправленного воздействия на экспрессию КНК, не образуется в целевой клетке при расщеплении  
 более крупной dsRNA.

dsRNA, описанная в данном документе, может дополнительно содержать один или несколько одно-  
 нитевых выступов нуклеотидов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей  
 мере один нуклеотидный выступ, могут обладать неожиданно более высокими ингибирующими свойст-  
 вами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступ может содержать аналог  
 нуклеотида/нуклеозид, в том числе дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Вы-  
 ступ(выступы) может(могут) находиться в смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комби-  
 нации. Кроме того, нуклеотид(нуклеотиды) выступа может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце  
 или обоих концах антисмысловой либо смысловой нити dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных в данной области тех-  
 ники, дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК,  
 такого как коммерчески доступный от, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения iRNA согласно настоящему изобретению можно получать с применением двухстадий-  
 ной процедуры. Во-первых, отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают по отдельности. За-  
 тем составляющие нити отжигают. Отдельные нити соединения iRNA siRNA можно получать с приме-  
 нением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Органический синтез  
 дает преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встре-  
 чающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Однонитевые олигонуклеотиды согласно на-  
 стоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического  
 синтеза или их обоих.

В одном аспекте dsRNA согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклео-  
 тидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность.

Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-7, а соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-7. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей практически комплементарна последовательности mRNA, образующейся при экспрессии гена КНК. В связи с этим в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в любой из табл. 3-7, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в любой из табл. 3-7. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

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. 3-7, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить с длиной минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предполагать, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-7, за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть столь же эффективны в сравнении с dsRNA, описанными выше. Следовательно, dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-7, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена КНК не более чем приблизительно на 5, на 10, на 15, на 20, на 25 или на 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность, рассматриваются как находящиеся в пределах объема настоящего изобретения.

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

При том, что целевая последовательность, как правило, имеет длину приблизительно 15-30 нуклеотидов, существует широкий спектр пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой заданной целевой РНК. Ряд пакетов программного обеспечения и рекомендации, изложенные в данном документе, служат в качестве руководства для идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного целевого гена, но также можно воспользоваться эмпирическим подходом, в котором "окно" или "рамку" данного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или условно (в том числе, например, *in silico*) накладывают на целевую последовательность РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Перемещая постепенно "окно" последовательности на один нуклеотид выше или ниже начального 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 техники) для идентификации последовательностей с оптимальными характеристиками можно идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании средством на основе iRNA опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, при том, что идентифицированные последовательности, например, в любой из табл. 3-7, 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. 3-7, 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 объединение этого подхода для получения новых мишеней-кандидатов вместе с тестированием

эффективности iRNA на основе этих целевых последовательностей в анализе ингибирования, известном из уровня техники или описанном в данном документе, может иметь результатом 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 выступа или других модификаций, известных из уровня техники и/или обсуждаемых в данном документе, для дополнительной оптимизации молекулы (например, повышения стабильности в сыворотке крови или периода полувыведения из крови, 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, описанная 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 нахождением 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 КНК, обычно не содержит какой-либо 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 КНК. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибками спаривания при ингибировании экспрессии гена КНК является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в гене КНК имеет полиморфную изменчивость последовательности в популяции.

### III. Модифицированные iRNA согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления РНК из числа iRNA согласно настоящему изобретению, например, dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгирования, известные из уровня техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа iRNA согласно настоящему изобретению, например, dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды в iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. iRNA согласно настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо разработанными в данной области техники, такими как те, которые описаны в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ при помощи ссылки. Модификации включают в себя, 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 (лишенные азотистого основания нуклеотиды) 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 iRNA, применимых в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают, без ограничения, РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. В контексте данного описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в их 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, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил-и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры 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 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают, без ограничения, патенты США

№№ 3687808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6,239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029;

и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора, включают 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; метиленаформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкеносодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые 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 вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, без ограничения, патенты США

№№ 5034506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; и 5677439,

полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи 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. Основания звеньев сохраняют для гибридизации с соответствующей нуклеиновой кислотой в качестве целевого соединения. 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, аминоксилглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и соединяются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупа амидной части остова. Иллюстративные 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 при помощи ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, предусматривают РНК с фосфоротиоатными 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 метилена(метилениминовый) 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>--] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова из вышеупомянутого патента 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 пригодные 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 равняются 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, аминоксиламино, полиалкиламино, замещенный силлил, расще-

плюющую 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 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>2</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 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 циклобутиловые фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают, без ограничения, патенты США

№№ 4981957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044;

5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722;

5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; и 5700920,

некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

iRNA также может содержать модификации или замещения нуклеотидного основания (часто называемого в данной области техники просто как "основание"). Как используется в данном документе, "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), а также пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-ме-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метилловые и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-пропиловые и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил(псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности, 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные соединения урацила и цитозина, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин. Дополнительные нуклеотидные основания включают таковые, раскрытые в патенте США № 3687808, таковые, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; таковые, раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, таковые, раскрытые в Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 и таковые, раскрытые 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 сродства связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 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'-O-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают, без ограничения, вышеуказанные патенты США

№№ 3687808; 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273;

5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540;

5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200;

6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610;

7,427,672; и 7495088,

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

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством связывания мостиком двух атомов. "Бициклический нук-

леозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид с сахарным фрагментом, содержащим мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, образуя, таким образом, бициклическую кольцевую систему. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство согласно 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, O.R. et al. (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами кольца рибозильного остатка. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов согласно 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 затрудненным 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. Org. 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 настоящим включено в данный документ при помощи 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; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

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

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Как используется 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-cEt".

iRNA согласно 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 стабильной конформации и повышает средство гибридизации с mRNA. Линкер имеет достаточную длину для помещения атома кислорода в оптимальное положение для стабильности и средства, 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 PCT-публикацию WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Один или несколько из нуклеотидов iRNA согласно настоящему изобретению также могут включать гидроксиметилзамещенный нуклеотид. "Гидроксиметилзамещенный нуклеотид" представляет собой ациклический 2'-3'-секонуклеотид, также называемый модификацией "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 настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации.

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

А. Модифицированные iRNA, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению.

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению включают в себя средства с химическими модификациями, раскрытыми, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в PCT/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710 или в заявке по PCT № PCT/US2012/065691, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства на основе iRNA, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства на основе iRNA могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство на основе iRNA может быть необязательно конъюгировано, например, смысловой нитью, с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства на основе iRNA характеризуются превосходной активностью сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства на основе iRNA полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства на основе iRNA или рядом с ним, активность средства на основе iRNA в отношении сайленсинга генов повышалась наилучшим образом.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухнитевые средства на основе iRNA, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена КНК) *in vivo*. Средство на основе iRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая нить средства на основе iRNA может варьировать по длине от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая нить может иметь длину от 14 до 30 нуклеотидов, иметь длину от 17 до 30 нуклеотидов, иметь длину от 25 до 30 нуклеотидов, иметь длину от 27 до 30 нуклеотидов, иметь длину от 17 до 23 нуклеотидов, иметь длину от 17 до 21 нуклеотида, иметь длину от 17 до 19 нуклеотидов, иметь длину от 19 до 25 нуклеотидов, иметь длину от 19 до 23 нуклеотидов, иметь длину от 19 до 21 нуклеотида, иметь длину от 21 до 25 нуклеотидов или иметь длину от 21 до 23 нуклеотидов.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют дуплексную двухнитевую РНК ("dsRNA"), также называемую в данном документе "средством на основе iRNA" или "средством iRNA". Дуплексный участок средства на основе iRNA может иметь длину 12-30 пар нуклеотидов. Например, дуплексный участок может иметь длину 14-30 пар нуклеотидов, иметь длину 17-30 пар нуклеотидов, иметь длину 27-30 пар нуклеотидов, иметь длину 17-23 пары нуклеотидов, иметь длину 17-21 пара нуклеотидов, иметь длину 17-19 пар нуклеотидов, иметь длину 19-25 пар нуклеотидов, иметь длину 19-23 пары нуклеотидов, иметь длину 19-21 пара нуклеотидов, иметь длину 21-25 пар нуклеотидов или иметь длину 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 iRNA может содержать один или несколько выступающих участков и/или копирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих нитей. Выступ может иметь длину 1-6 нуклеотидов, например, иметь длину 2-6 нуклеотидов, иметь длину 1-5 нуклеотидов, иметь длину 2-5 нуклеотидов, иметь длину 1-4 нуклеотида, иметь длину 2-4 нуклеотида, иметь длину 1-3 нуклеотида, иметь длину 2-3 нуклеотида или иметь длину 1-2 нуклеотида. Выступы могут быть обусловлены тем, что одна нить является длиннее другой, или быть обусловлены тем, что две нити одинаковой длины расположены несимметрично. Выступ может осуществлять ошибочное спаривание с целевой mRNA 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 на основе iRNA независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе, без ограничения, имеющим сахар с 2'-модификацией, как, например, 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, ТТ может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой нити. Выступ может осуществлять ошибочное спаривание с целевой mRNA или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства на основе iRNA могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий(выступающие) участок(участки) содержит(содержат) два нуклеотида с фосфоротиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В одном варианте осуществления вы-

ступ присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует в антисмысловой нити. В другом варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует в смысловой нити.

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

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 19 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 7, 8, 9 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.

В другом варианте осуществления средство на основе iRNA представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 20 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 8, 9, 10 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.

В еще одном варианте осуществления средство на основе iRNA представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 21 нуклеотид, 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.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA 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 на основе iRNA 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 фосфоротиоатные 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 на основе iRNA дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми 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 на основе iRNA, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Средство на основе iRNA необязательно дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc3).

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA содержит смысловую и антисмысловую нить, где смысловая нить имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения с 1 до 23 первой нити содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая нить имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, образуя, таким образом, 3'-односторонний выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя, таким образом, 5'-односторонний выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, при этом смысловая и антисмысловая нити выровнены для максимальной комплементарности, образуя, таким образом, практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмы-

словая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство на основе iRNA содержит первую нить с длиной, составляющей по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую нить с длиной, составляющей не более 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где дуплексный участок имеет длину по меньшей мере 25 нуклеотидов, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити для снижения экспрессии целевого гена, где средство на основе iRNA вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства на основе iRNA при помощи Dicer предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую 3'-конец второй нити, снижая, таким образом, экспрессию целевого гена у млекопитающего. Средство на основе iRNA необязательно дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства на основе iRNA содержит по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

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

Для средства на основе iRNA с дуплексным участком длиной 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой нити обычно находится около 10, 11 и 12 положений 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-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка iRNA от 5'-конца.

Смысловая нить средства на основе iRNA может содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями 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 смысловая нить средства на основе iRNA может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация прилегает к первому мотиву либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, химическая структура мотивов отличается друг от друга, а если мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления, или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства на основе iRNA может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства на основе iRNA обычно не включает первые один или два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства на основе iRNA обычно не включает первые один или два спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства на основе iRNA содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства на основе iRNA содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены так, что две модификации, каждая из одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая из одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации из одной нити попадают по обе стороны от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства на основе iRNA, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицированным. Каждый нуклеотид может быть модифицированным одинаковыми или разными модификациями, которые могут включать 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'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфоризованными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерами из субъединиц, то многие из модификаций встречаются в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или несвязанного с фосфатным фрагментом O. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухнитевом участке, в однонитевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в однонитевом участке РНК. Например, фосфоротионатная модификация в положении несвязанного O 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 однонитевом участках, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Это может быть возможно, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступы или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в однонитевые выступы, например, в 5'- или 3'-выступ или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступах могут быть модифицированы, например, при помощи модификации, описанной в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-O-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификации фосфатной группы, например, фосфоротионатные модификации. Выступы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезоксид, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-O-метилом или 2'-фтором.

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

В одном варианте осуществления N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", используемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

"АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...",

"АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..."

и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая

из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВВВВВВ..." или "СДСДСД..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению имеет сдвиг паттерна модификаций для чередующегося мотива смысловой нити относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и наоборот. 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 на основе iRNA изначально имеет сдвиг паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити относительно паттерна чередующегося мотива из 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 антисмысловой нити и наоборот. 1 положение 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 первоначальный 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 если мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, 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 за мотивом "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 случае, если присутствует фланкирующая модификация.

Средство на основе iRNA может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити, или антисмысловой нити, или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться 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 модификации межнуклеотидной связи смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой нити может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления iRNA имеет модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи могут находиться между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. 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 выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфоротиоатные межнуклеотидные

связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство на основе iRNA может дополнительно иметь две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA содержит ошибку(ошибки) спаривания с мишенью в дуплексе или их комбинации. Ошибка спаривания может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать, исходя из их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, наиболее простым подходом является изучение пар по отдельным парам оснований, однако можно также выполнить анализ следующей соседней пары или подобный). В плане 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). Ошибки спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других местах данного документа), более предпочтительны, чем канонические типы спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальные основания, более предпочтительны, чем канонические типы спаривания.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA 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 1 положении в дуплексном участке от 5'-конца в 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 дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU.

В одном варианте осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (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;

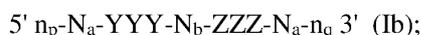
где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию и

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  $N_b$  имеет модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство на основе iRNA содержит дуплексный участок длиной 17-23 нуклеотидов, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или рядом с ним (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 как  $i$ , так и  $j$  равняются 1. Смысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеоти-

дов. 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),  $N_b$  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.

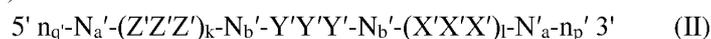
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

В других вариантах осуществления  $i$  равняется 0 и  $j$  равняется 0, при этом 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 iRNA 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 представляет 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 с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

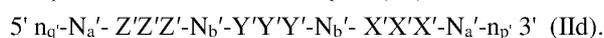
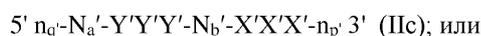
В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  имеет модификации чередующегося паттерна.

Мотив  $Y'Y'Y'$  находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство на основе iRNA содержит дуплексный участок длиной 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 как  $k$ , так и  $l$  равняются 1.

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

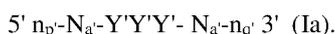


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (Iib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность,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

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (Iic),  $N_b'$  представляет собой 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 (Iid), 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 и  $l$  равняется 0, при этом антисмысловая нить может быть представлена формулой



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIa), 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.

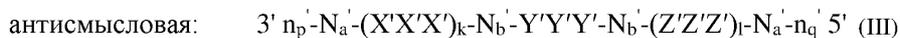
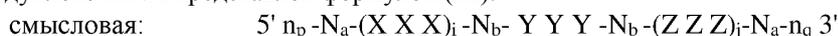
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован LNA, CRN, сET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом 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 на основе iRNA может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, если 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. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; при этом каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 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. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; при этом каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-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 на основе iRNA для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить имеет от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс iRNA представлен 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  $N_a$  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  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

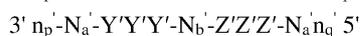
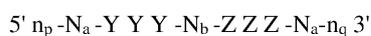
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

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

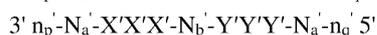
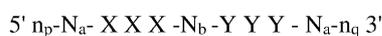
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс iRNA, включают формулы, приведенные ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIд)

В тех случаях, когда средство на основе iRNA 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 на основе iRNA 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 на основе iRNA 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 на основе iRNA представлено формулой (IIIд), 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  $N_a$ ,  $N_a'$  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 имеет модификации чередующегося паттерна.

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

В тех случаях, когда средство на основе iRNA представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIд), 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 на основе iRNA представлено формулой (IIIb) или (IIIд), 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 на основе iRNA представлено формулой (IIIc) или (IIIд), 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 на основе iRNA представлено формулой (IIIд), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство на основе iRNA представлено формулой (IIIд), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, а  $n_p' > 0$ , при этом по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. В еще одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство на основе iRNA представлено формулой (IIIд), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , при этом по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной 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 на основе iRNA представлено формулой (III<sub>d</sub>), модификациями N<sub>a</sub> являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, n<sub>p</sub>' > 0, при этом по меньшей мере один n<sub>p</sub>' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную 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 на основе iRNA представлено формулой (III<sub>a</sub>), модификациями N<sub>a</sub> являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, n<sub>p</sub>' > 0, при этом по меньшей мере один n<sub>p</sub>' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулами (III), (III<sub>a</sub>), (III<sub>b</sub>), (III<sub>c</sub>) и (III<sub>d</sub>), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (III), (III<sub>a</sub>), (III<sub>b</sub>), (III<sub>c</sub>) и (III<sub>d</sub>), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два средства на основе iRNA, представленные формулами (III), (III<sub>a</sub>), (III<sub>b</sub>), (III<sub>c</sub>) и (III<sub>d</sub>), соединены друг с другом на 5'-конце, а один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена или каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные средства на основе iRNA, которые можно изменять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США №№ 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Как описано более подробно ниже, средство на основе iRNA, которое содержит один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством на основе iRNA, может улучшать одно или несколько свойств средства на основе iRNA. Во многих случаях углеводный фрагмент будет прикреплен к модифицированной субъединице средства на основе iRNA. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно замещать другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был замещен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией-замещением 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 быть полностью насыщенной кольцевой системой или он 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". Выражение "точка присоединения к остову", используемое в данном документе, означает функциональную группу, например, гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную для введения носителя в остов и которая подходит для этого, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серосодержащий остов рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления означает входящий в кольцо атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный 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 соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, с составным кольцом.

Средства на основе iRNA можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, 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, ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, представляющего собой диэтаноламин.

В некоторых конкретных вариантах осуществления средство на основе iRNA для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из табл. 3-7. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

#### IV. iRNA, конъюгированные с лигандами.

Другая модификация РНК из числа iRNA согласно настоящему изобретению включает химическое связывание РНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение iRNA. 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., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-тригилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецило-вые 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), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин, или гексиламинокарбонилхлестеринный фрагмент (Stooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время действия средства на основе iRNA, в которое он введен. 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 быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли-L-лактоида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)метакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, 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. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактоз амин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин В12, витамин А, биотин, или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафирин, 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, геранилосигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситригил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино,

меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин E, 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 отличные от пептидов соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лигандом, например, 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, например, может быть таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин A, фаллоидин, свинголид A, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к iRNA, которая описана в данном документе, действует в качестве фармакокинетического модулятора (PK-модулятора). PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные PK-модуляторы включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве PK-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются с сывороточными компонентами (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве PK-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такого как, 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 связующий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, можно получать удобным и обычным способом путем хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими фирмами-изготовителями, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные из уровня техники. Также известно применение подобных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандами олигонуклеотидах и нуклеозидах, связанных с определенными последовательностями молекулы лиганда, согласно настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов с лигандом, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих отличный от нуклеозида лиганд.

При применении предшественников конъюгатов нуклеотидов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез нуклеозидов, связанных с определенными последовательностями, как правило, завершают и молекулу лиганда затем приводят в реакцию со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов нуклеозидов с лигандами, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в синтезе олигонуклеотидов.

А Конъюгаты липидов.

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связыва-

вающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевой ткани, например, отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхимные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) 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, менее вероятно, что липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA более сильно, будет нацелен на почки и, таким образом, менее вероятно, что он будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в ткани, отличной от ткани почек. Однако, предпочтительно, чтобы аффинность не была столь 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 почке. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки почек, также можно использовать вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Он является особенно пригодным 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 HSA 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 antennopedia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, при этом средство может включать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных, или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральным средством предпочтительно является 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 сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную природному пептиду. Присоединение пептида или пептидомиметиков к средствам на основе iRNA может влиять на фармакокинетическое распределение iRNA, как, например, посредством усиления распознавания клеток и абсорбции ими. Пептидный фрагмент или фрагмент-пептидомиметик может иметь длину приблизительно 5-50 аминокислот, например, иметь длину 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 Tug, Trp или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В качестве другой альтернативы, пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 13). RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 14), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом.

Пептидный фрагмент может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 15) и белка Antennapedia дрозофилы (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной единицы с целью нацеливания на клетку, является пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Пептидный фрагмент может варьировать

по длине в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут характеризоваться структурной модификацией, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любые из структурных модификаций, описанных ниже.

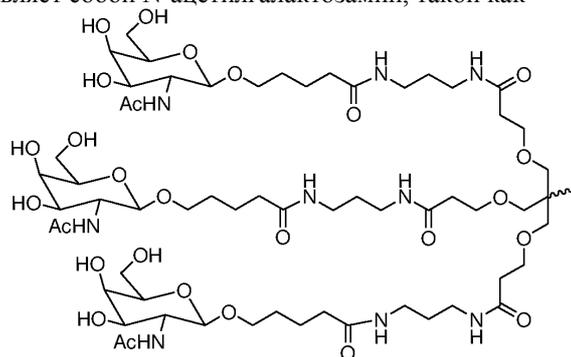
RGD-пептид для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован для облегчения нацеливания на определенную ткань(ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацелены на PECAM-1 или VEGF.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, может быть, например,  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например,  $\alpha$ -дефенсин,  $\beta$ -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из большого T-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

### С. Углеводные конъюгаты.

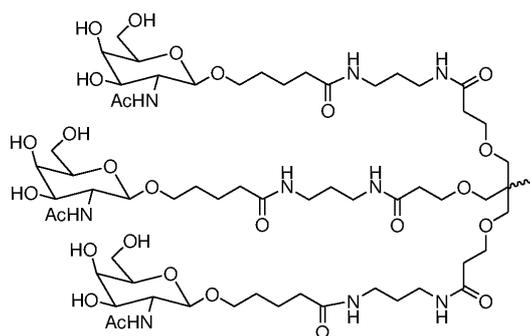
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов согласно настоящему изобретению олигонуклеотид iRNA дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом iRNA является предпочтительной для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, пригодных для *in vivo* терапевтического применения, описанного в данном документе. Используемое в данном документе выражение "углевод" относится к соединению, которое представляет собой углевод *per se*, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединению, имеющему в качестве его части углеводный фрагмент, образованный из одного или нескольких моносахаридных звеньев, каждое из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Определенные моносахариды включают сахара из C5 и более (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными звеньями (например, C5, C6, C7 или C8).

В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

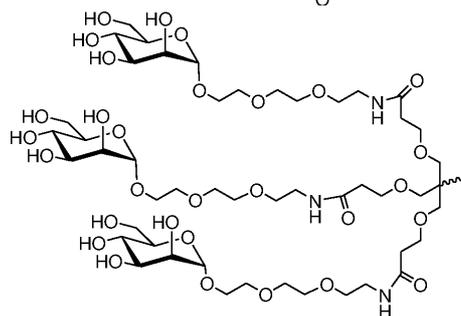


, формула II.

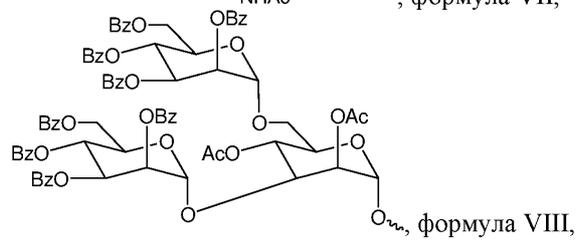
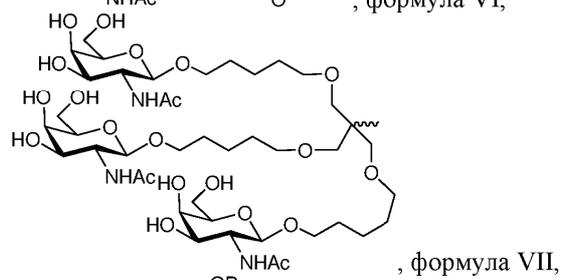
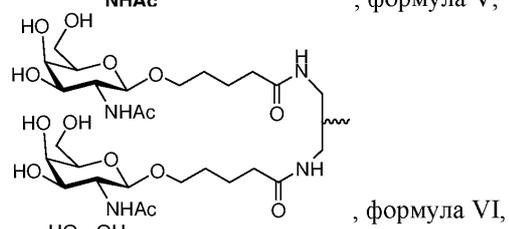
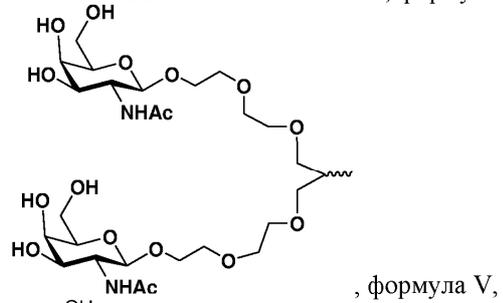
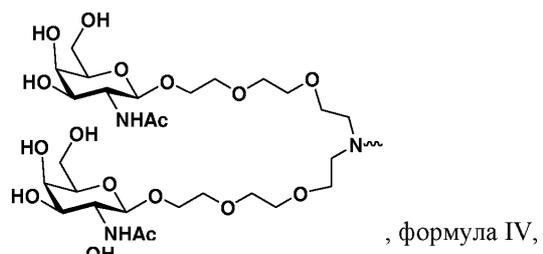
В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:

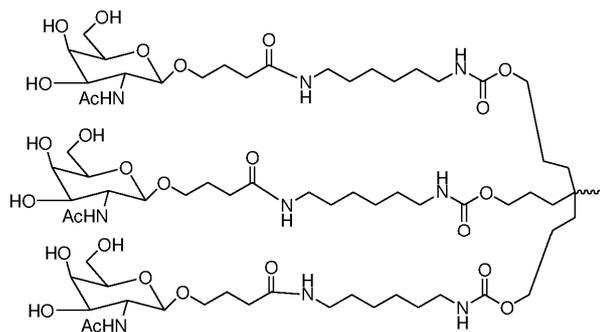


, формула II,

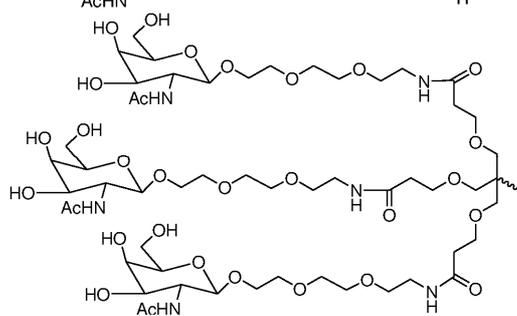


, формула III,

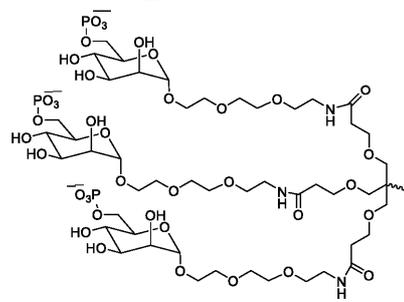




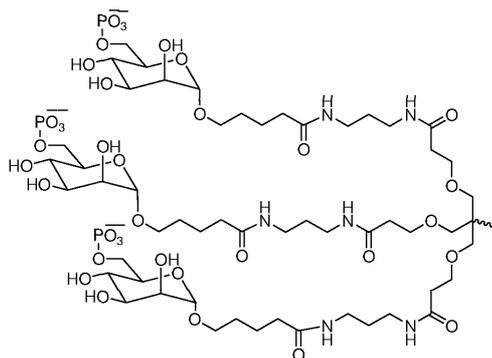
, формула IX,



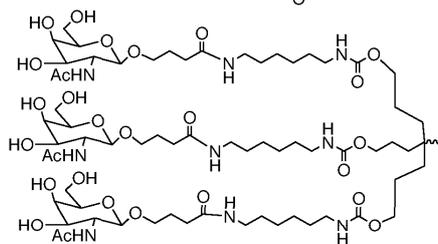
, формула X,



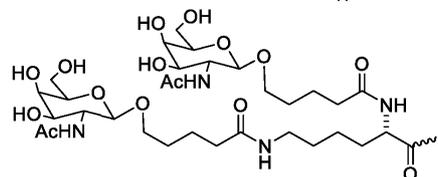
, формула XI,



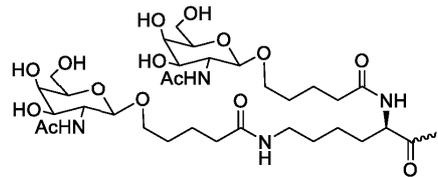
, формула XII,



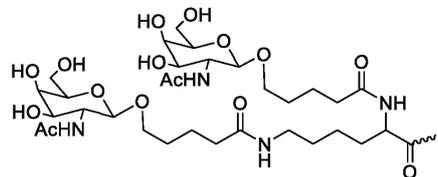
, формула XIII,



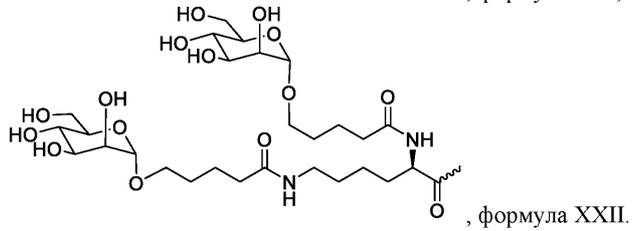
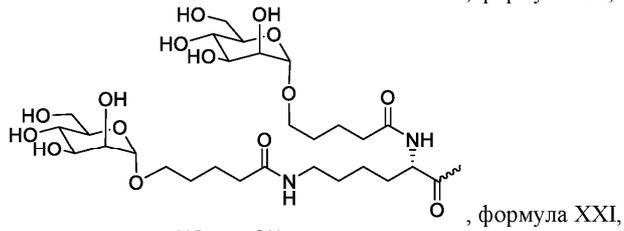
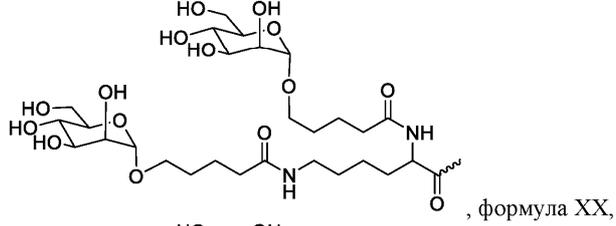
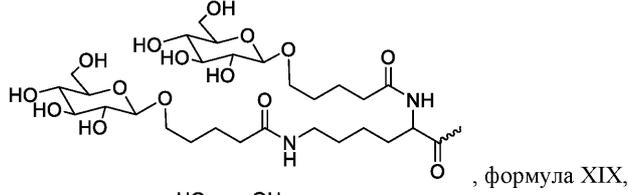
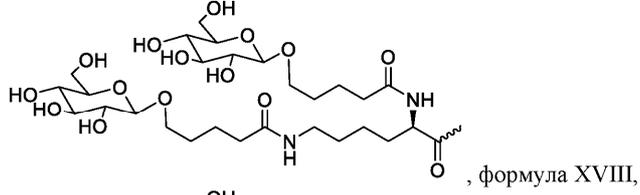
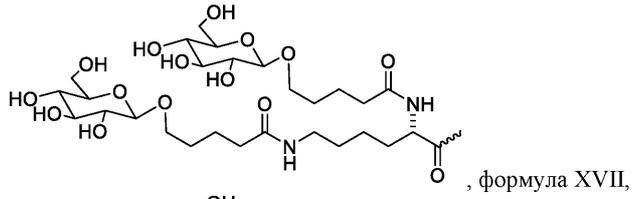
, формула XIV,



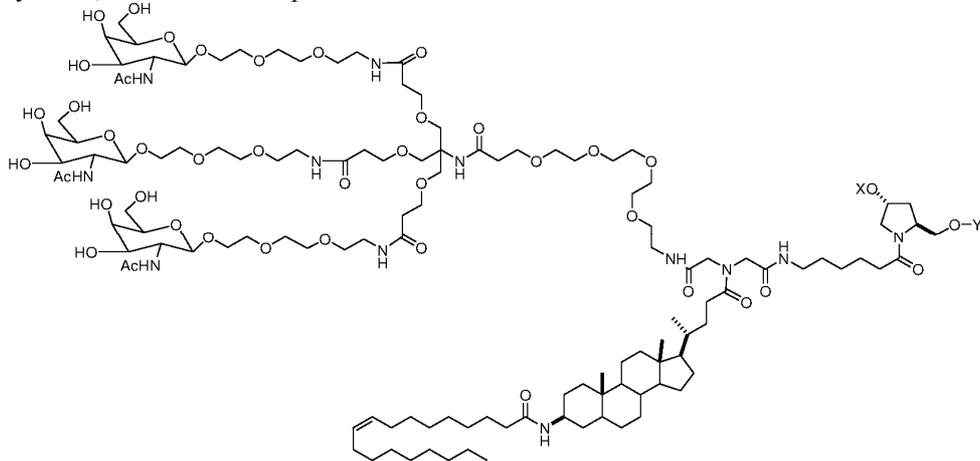
, формула XV,



, формула XVI,



Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



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

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

Дополнительные углеводные конъюгаты, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают таковые, как описанные в РСТ-публикациях №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в данный документ при помощи ссылки.

#### D. Линкеры.

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

Выражение "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 NR8, 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, гетероциклический алкил, гетероциклический алкенил, гетероциклический алкинил, арил, гетероарил, гетероциклический, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклический алкил, алкилгетероциклический алкенил, алкилгетероциклический алкинил, алкенилгетероциклический алкил, алкенилгетероциклический алкенил, алкенилгетероциклический алкинил, алкинилгетероциклический алкил, алкинилгетероциклический алкенил, алкинилгетероциклический алкинил, 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(R8), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенным или незамещенным гетероциклическим; где R8 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 является достаточно стабильной вне клетки, но при поступлении в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется приблизительно в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз или более или по меньшей мере приблизительно в 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, которые имеют место в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к средствам расщепления, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или обнаружены на более высоких уровнях или активности 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 редокс-расщепляемую линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, таковые, которые приводят к рН, равному пять 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 восприимчивой к рН. рН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как среднее внутриклеточное рН составляет немного ниже, в пределах приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым рН, около 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутрь клетки или в предпочтительный компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, лиганд, нацеливаемый на печень, может быть связан с катионным липидом с помощью линкера, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие богатые эстеразами типы клеток включают клетки легкого, коры почек и яичка.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на богатые пептидазами типы клеток, 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 кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательным также будет тестирование кандидатной расщепляемой линкерной группы 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. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в совокупности. Может быть полезно произвести первоначальные оценки в условиях бесклеточной системы или в условиях культуры и подтвердить дальнейшими оценками на животных в совокупности. В предпочтительных вариантах осуществления пригодные кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере приблизительно в 2, в 4, в 10, в 20, в 30, в 40, в 50, в 60, в 70, в 80, в 90 или приблизительно в 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 линкерную 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 определенным фрагментом iRNA и определенным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидат может быть оценен при помощи инкубирования с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, 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 кандидатные соединения расщепляются в крови не более чем на приблизительно 10%. В других вариантах осуществления пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере приблизительно в 2 раза, в 4 раза, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 60 раз, в 70 раз, в 80 раз, в 90 раз или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений может быть определена при помощи стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточных сред, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточных сред.

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 клеточные фосфатазы. 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-. Предпочтительным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотами линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется при 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 pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить среду для расщепления 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 углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппе), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или четвертичную алкильную группу, такую как диметилпентил или третбутил. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

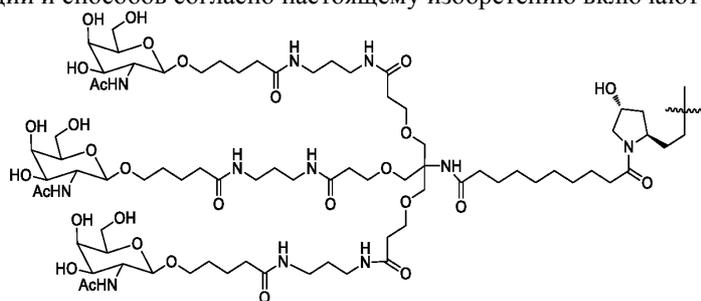
## iv. Сложноэфирные линкерные группы.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную расщепляемую линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как клеточные эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают, без ограничения, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

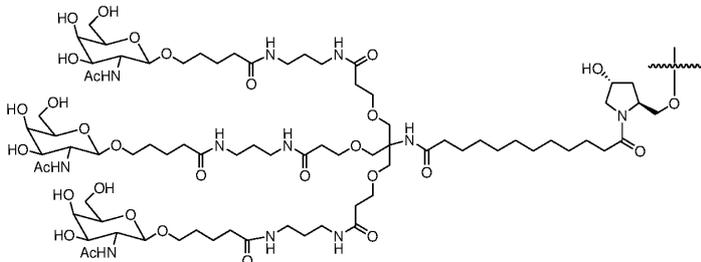
## v. Пептидные расщепляемые группы.

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит пептидную расщепляемую линкерную группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется ферментами, такими как клеточные пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу  $(-C(O)NH-)$ . Амидная группа может образовываться между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу целиком. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

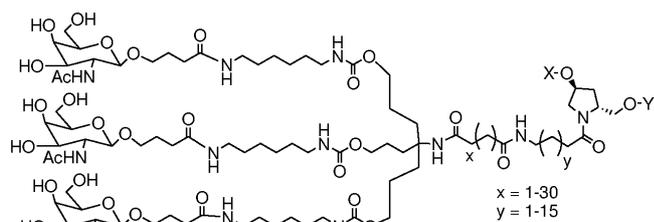
В одном варианте осуществления iRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов с iRNA с линкерами для композиций и способов согласно настоящему изобретению включают без ограничения



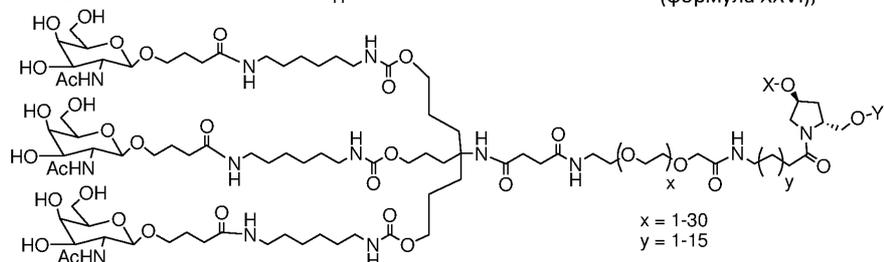
(формула XXIV),



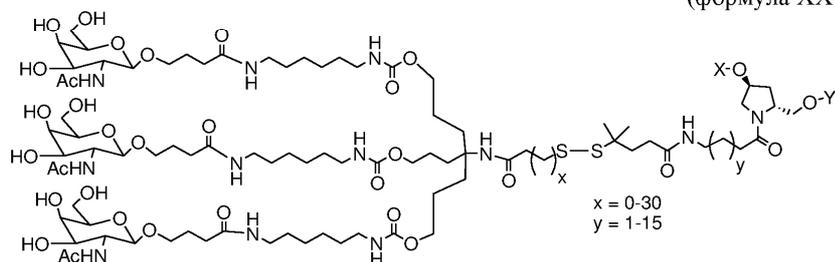
(формула XXV),



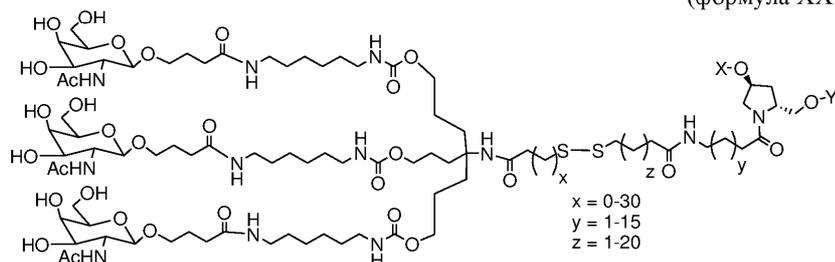
(формула XXVI),



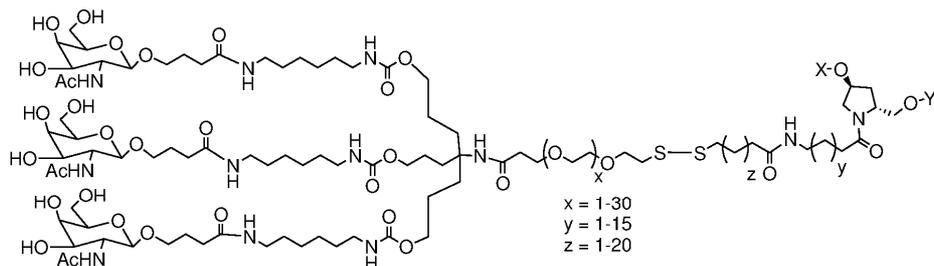
(формула XXVII),



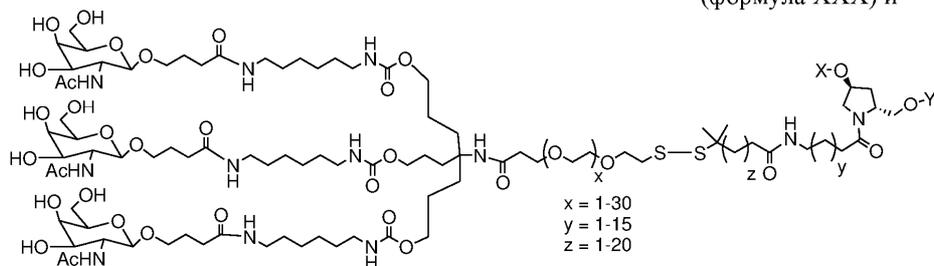
(формула XXVIII),



(формула XXIX),



(формула XXX) и



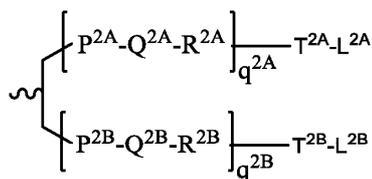
(формула XXXI),

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

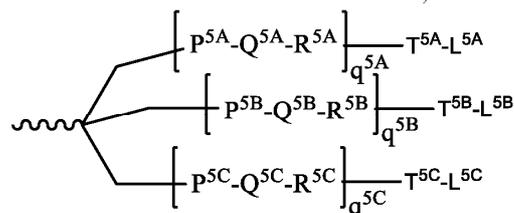
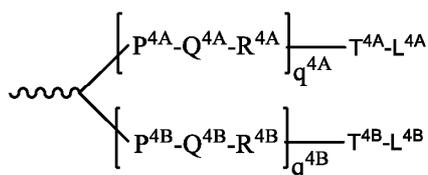
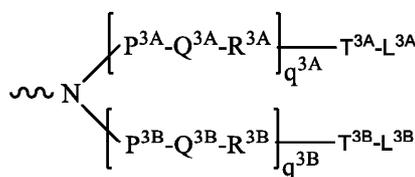
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов согласно настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления dsRNA согласно 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

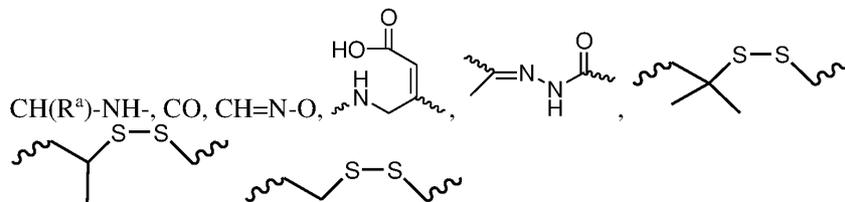
формула XXXV

где  $q^{2A}$ ,  $q^{2B}$ ,  $q^{3A}$ ,  $q^{3B}$ ,  $q^{4A}$ ,  $q^{4B}$ ,  $q^{5A}$ ,  $q^{5B}$  и  $q^{5C}$  независимо представляют собой для каждого случая 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или различной;

каждый из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{5A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  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;

$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или 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);

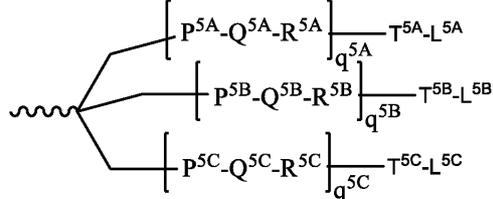
каждый из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-



или гетероцикл;

$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т.е. каждый из них независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и  $R^a$  представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентно конъюгированные производные GalNAc особенно пригодны для применения со средствами на основе RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, например, таковые формулы (XXXV):

формула XXXV



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

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.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения конъюгатов РНК включают, без ограничения, патенты США

№№ 4828979; 4,948,882; 5,218,105;  
 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124;  
 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044;  
 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582;  
 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022;  
 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723;  
 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142;  
 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 и 5,688,941; 6,294,664;  
 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; 8,106,022,

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

Не является необходимым, чтобы все положения в данном соединении были единообразно модифицированными, и на самом деле несколько из вышеуказанных модификаций может быть включено в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в iRNA. Настоящее изобретение также включает соединения iRNA, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения iRNA или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения iRNA, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически различных участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т.е. нуклеотида, в случае соединения dsRNA. Данные iRNA обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы придать iRNA повышенную устойчивость к разрушению нуклеазой, улучшенное поглощение клеткой и/или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок iRNA может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы H является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет РНК-нить в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью iRNA. Следовательно, при применении химерных dsRNA часто можно получить сравнимые результаты для более коротких iRNA по сравнению с фосфоротиоатдезоксидными dsRNA, гибридирующимися с тем же целевым участком. Расщепление РНК-мишени обычно можно выявить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, методиками гибридизации связанных нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

В некоторых случаях РНК из числа iRNA может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, были конъюгированы с iRNA в целях повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения iRNA, и процедуры выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включают 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), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (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 три-этил-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), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантан-уксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламин, или гексиламинокарбонилкоксихолестериновый 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. Затем аминоклипер подвергают реакции с молекулой, подлежащей конъюгированию, с применением соответствующих реагентов конденсации или активации. Реакцию конъюгирования можно выполнять с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК в фазе раствора. Посредством очистки конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, получают чистый конъюгат.

V. Доставка iRNA согласно настоящему изобретению.

Доставку iRNA согласно настоящему изобретению к клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с заболеванием, нарушением или состоянием ассоциированным с фосфорилированием фруктозы при помощи КНК), можно

осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA согласно 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 описаны ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для применения с iRNA согласно 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 при помощи ссылки в полном их объеме). Что касается доставки *in vivo*, 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 имплантации 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. В нескольких исследованиях был показан эффективный нокдаун продуктов гена при введении iRNA локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, M.J., et al. (2004) Retina 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, S.J., 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 срок выживаемости мышей с опухолями (Kim, W.J., 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 путем прямой инъекции (Dorn, G., et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, P.H., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, G.T., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, E.R., 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, K.A., 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, РНК может быть модифицирована или, альтернативно, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; при этом 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 при помощи химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, направленную против ApoB iRNA, конъюгированную с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, инъекцировали системно мышам, что приводило к нокдауну mRNA apoB 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 мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara, J.O., 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 увеличивают 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 везикулы 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 введении системно. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, Sorensen, D.R., et al. (2003) J. Mol. Biol. 327:761-766; Verma, U.N., et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:1291-1300; Arnold, A.S. et al. (2007) J. Hypertens. 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном их объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), выше; Verma, U.N., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, T.S., et al. (2006) Nature 441:111-114), кардиолипин (Chien, P.Y., 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 печатью 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, D.A., 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 на основе iRNA и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки в полном его объеме.

А. Вектор, кодирующий iRNA согласно изобретению.

iRNA, целенаправленно воздействующая на ген C5, может экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (приблизительно от 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 качестве альтернативы, 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, являются ДНК-плазмидами или вирусными векторами. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно применять для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, как описано в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны из уровня техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в необходимую целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии iRNA в виде комплекса с носителями-катионными липидами (например, олигофектаминол) или носителями на основе некаатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для типов iRNA-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить при помощи 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, антибиотикам и лекарственным средствам), как, например, устойчивость к гигромицину В.

Вирусные векторные системы, 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 мышинного 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 коровьей оспы, или авипокс, например, канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть включена в векторы, способные к эпизодической 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, пригодные для доставки iRNA, будут включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии iRNA в необходимой целевой клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения конститутивной либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням глюкозы в крови или гормонам (Docherty et al., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогаляктопиранозида (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 Voese 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, описанные в патентах США №№ 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для применения в доставке iRNA согласно настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов в респираторный эпителий. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and 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 макака-резуса. 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); РСТ-публикации 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 согласно 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 одностранных 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; патенте США № 5139941; международной заявке на выдачу патента № WO 94/13788 и международной заявке на выдачу патента № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки iRNA согласно настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус коровьей оспы, например, аттенуированный вирус коровьей оспы, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, оспа кур или канарипокс.

В случае необходимости тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замены различных вирусных капсидных белков. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из 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 при помощи ссылки.

Фармацевтический препарат на основе вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки ге-

нов. В качестве альтернативы, в случае, когда вектор доставки целого гена может вырабатываться нативно рекомбинантными клетками, например, ретровирусные векторы, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые вырабатывают систему доставки генов.

#### VI. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, описанную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, являются пригодными для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена КНК. 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 согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена КНК.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем внутривенной инфузии в течение 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, раз в неделю, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После осуществления схемы первичного лечения лекарственные препараты можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или 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 общую суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны из уровня техники и особенно пригодны для доставки средств в определенный участок, например, их можно применять со средствами согласно настоящему изобретению. В данном варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее количество суточной дозы.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят каждые два месяца.

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

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от участка, подлежащего обработке. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе при помощи ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает в себя 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, как, например, например, печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут

быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Также могут быть пригодными покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают таковые, в которых iRNA, описанные 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 нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)). iRNA, описанные 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-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C<sub>1-20</sub>алкиловые эфиры (например, изопропилмиристенат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

А. Составы на основе iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли.

iRNA для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например, липосоме или мицелле. Используемое в данном документе выражение "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 часть. 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 пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при применении липосом к тканям бислою липосомы сливается 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 iRNA. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство на основе iRNA, можно получать рядом способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в моющем средстве, так что образуются мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может быть амфипатическим катионным липидом или липидным конъюгатом. Моющее средство может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные моющие средства включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат 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 образованием липосомы. После конденсации моющее средство удаляют, например, путем диализа, с получением липосомного препарата средства на основе iRNA.

При необходимости в ходе реакции конденсации можно добавлять соединение-носитель, которое содействует 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 доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного липида в качестве структурных компонентов средств доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ при помощи 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; патенте США № 4897355; патенте 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 применения их в качестве средств доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экстракцией (см., например, Mayer, et al., Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно применять в тех случаях, когда желательны 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 широких класса. Катионные липосомы являются положительно заряженными липосомами, 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 свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Липосомы с pH-чувствительностью применяли 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 главный тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от полученного естественным образом фосфатидилхолина. Композиции нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом, как правило, образованы из димристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы, главным образом, 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 фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

Примеры других способов для 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.

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), применяли для доставки циклоспорина-A в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные 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, которые в качестве термина, используемого в данном документе, означают липосомы, содержащие один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть липидной составляющей, образующей везикулу липосомы (A), содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G<sub>M1</sub>, или (B), полученная из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не вдаваясь в какую-либо конкретную теорию, в данной области техники полагают, 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 из уровня техники. Parahadjopoulos et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозида G<sub>M1</sub>, сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти результаты 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<sub>M1</sub> или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

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

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных 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 аспектами в получении липосомных составов являются заряд поверхности 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 сильно анионных 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 прикрепляются 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 токовые, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермином, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиооктоолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPE") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Chol"), 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 при трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, известны проявлением более низкой токсичности и обеспечением более эффективной трансфекции, чем DOTMA содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMR1E и DMR1E-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 в особенности подходят для местного применения, при этом липосомы представляют некоторые преимущества по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие по отношению к высокой системной абсорбции введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в необходимой мишени и возможность введения средства на основе iRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы применяют для доставки средства на основе iRNA в эпидермальные клетки, а также для повышения проникновения средства на основе iRNA в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно применять 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).

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), применяли для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы со средством на основе iRNA пригодны для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше, чем средний радиус липосомы. Например, типом деформируемых липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые включают средство на основе iRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства на основе iRNA в кератиноциты кожи. Для того, чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего внутрикожного градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и, зачастую, могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с серийными №№ 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В PCT заявке № PCT/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью к деформации, которые являются перспективными кандидатами в качестве средств доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферсомы являются приспособляемыми к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают своих мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы применяли для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами 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 распределения 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 неионное поверхностно-активное вещество. Неионные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их можно применять при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионные поверхностно-активные вещества включают неионные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерола, сложные эфиры полиглицерола, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионные алканоамиды и эфиры, такие как этоксилаты жирного спирта, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блоксополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионных 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, ациллактаты, 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 ее растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают четвертичные соли аммония и этоксилированные амины. Четвертичные соли аммония являются наиболее применяемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести как положительный, так 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).

iRNA для применения в способах согласно настоящему изобретению может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы организованы в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекулы направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части соприкасающимися с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные 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, глицеролевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурчника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять во время или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом виде смешивания ингредиентов, кроме интенсивного перемешивания для получения мицелл с меньшим размером.

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 с интенсивным смешиванием.

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 смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея 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 одной, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением части содержимого, например, посредством дозирующего клапана. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсной струи.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилвый 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 при помощи проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто необходимо увеличить, например, по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

#### В. Липидные частицы.

iRNA, например, dsRNA, согласно настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например, LNP или другой частице на основе нуклеиновой кислоты-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице на основе нуклеиновой кислоты-липид. LNP, как правило, содержат катионный липид, некаатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма 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 места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который изложен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр 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 на основе нуклеиновой кислоты-липиды согласно настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы на основе нуклеиновой кислоты-липиды и

способ их получения раскрыт, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и PCT публикации № 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-диолеилоксипропиламин (DODMA), 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дидиолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дидиолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дидиолеилокси-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дидиолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеилокси-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2-дидиолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA·Cl), хлористую соль 1,2-дидиолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TAP·Cl), 1,2-дидиолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дидиолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дидиолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[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-((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 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц на основе липида-siRNA. Синтез 2,2-дидиолеил-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 при помощи ссылки.

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

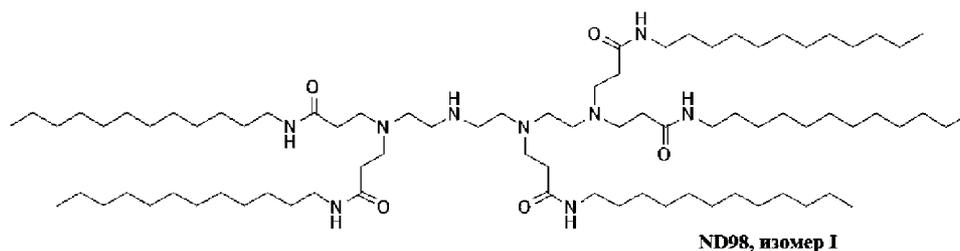
Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеил-фосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеил-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-олеил-фосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 мол.% до приблизительно 90 мол.%, приблизительно 10 мол.% 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 (PEO)-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 ( $C_{18}$ ). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% 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 дополнително включает холестерин в количестве, например, от приблизительно 10 мол.% до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

Согласно одному варианту осуществления липидоид ND98±4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно применять для получе-

ния наночастицы на основе липида-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы каждого в этаноле 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, в 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 экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с порами 100 нм) при помощи, например, экструдера с термоцилиндром, такого как экструдера Lipex (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например, фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) с pH приблизительно 7, например, pH приблизительно 6,9, pH приблизительно 7,0, pH приблизительно 7,1, pH приблизительно 7,2, pH приблизительно 7,3 или pH приблизительно 7,4.



### Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая настоящим включена при помощи ссылки.

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

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
SNALP-1	1,2-дидиоленилокси-N,N-диметиламинопропан(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5,

		липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 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 50/10/38,5/1,5 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 50/10/38,5/1,5 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 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:siRNA 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:siRNA 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 7:1

LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:siRNA 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со ср. мол. весом 2000).

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилоксид-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая настоящим включена при помощи ссылки.

Составы, содержащие XTC, описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке США с серийным №, поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые настоящим включены при помощи ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой настоящим включено при помощи ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной заявке на выдачу патента с номером PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая настоящим включена при помощи ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке № PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые настоящим включены при помощи ссылки.

Синтез ионизируемых/катионных липидов.

Любое из соединений, например, катионные липиды и т.п., применяемые в частицах на основе нуклеиновой кислоты-липиды согласно настоящему изобретению, можно получать при помощи известных методик органического синтеза, в том числе способов, описанных более подробно в примерах. Все заместители являются такими, как определено ниже, если не указано иное.

"Алкил" означает углеводород с прямой цепью или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Типичные насыщенные алкилы с прямой цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п.; тогда как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Типичные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п.

"Алкенил" означает алкил, который определен выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Типичные алкенилы с прямой нитью и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил, определенные выше, которые дополнительно содержат по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Типичные алкинилы с прямой цепью и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

"Ацил" означает любой алкил, алкенил или алкинил, в которых атом углерода в точке присоединения замещен оксогруппой, которая определена ниже. Например,  $-C(=O)$ алкил,  $-C(=O)$ алкенил и  $-C(=O)$ алкинил представляют собой ацильные группы.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, ненасыщенным, либо ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, а гетероатом азота необязательно может быть кватернизирован, в том числе бициклические кольца, в которых любой из вышеперечисленных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, которые определены ниже. Гетероциклы включают морфолин, пирролидиноил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

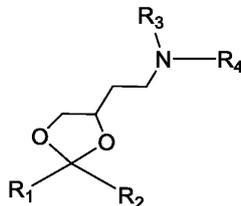
Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя ( $=O$ ) замещаются два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо, галоген, гетероцикл,  $-CN$ ,  $-OR_x$ ,  $-NR_xR_y$ ,  $-NR_xC(=O)R_y$ ,  $-NR_xSO_2R_y$ ,  $-C(=O)R_x$ ,  $-C(=O)OR_x$ ,  $-C(=O)NR_xR_y$ ,  $-SO_nR_x$  и  $-SO_nNR_xR_y$ , где  $n$  равняется 0, 1 или 2,  $R_x$  и  $R_y$  являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных заместителей алкила и гетероцикла дополнительно может быть замещен одним или несколькими из оксо, галогена,  $-OH$ ,  $-CN$ , алкила,  $-OR_x$ , гетероцикла,  $-NR_xR_y$ ,  $-NR_xC(=O)R_y$ ,  $-NR_xSO_2R_y$ ,  $-C(=O)R_x$ ,  $-C(=O)OR_x$ ,  $-C(=O)NR_xR_y$ ,  $-SO_nR_x$  и  $-SO_nNR_xR_y$ .

"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

В некоторых вариантах осуществления в способах согласно настоящему изобретению может потребоваться применение защитных групп. Методика с использованием защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную химическую активность функциональной группы. Защитную группу можно добавлять к функциональной группе для блокирования ее химической активности во время определенных реакций, а затем удалять с открытием исходной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления применяют "защитную группу для спиртовой группы". "Защитная группа для спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в данной области.

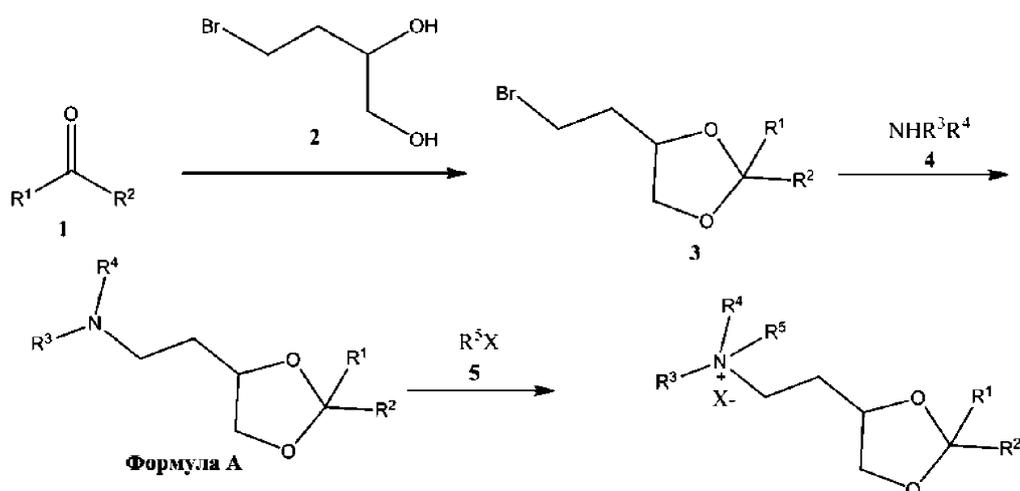
Синтез формулы А.

В некоторых вариантах осуществления частицы на основе нуклеиновой кислоты-липида согласно настоящему изобретению составляют при помощи катионного липида формулы А:



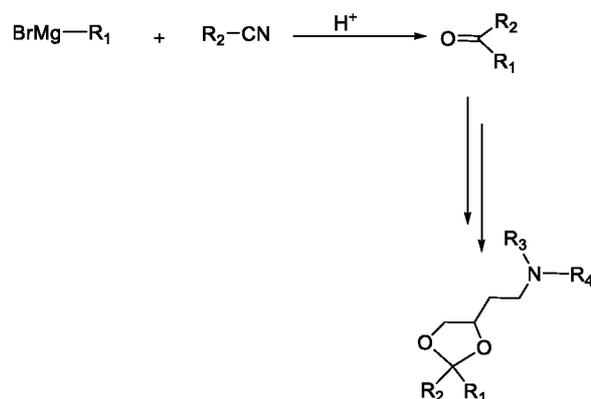
где  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой низший алкил или  $R_3$  и  $R_4$  могут быть соединены с образованием необязательно замещенного гетероциклического кольца. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). Как правило, липид формулы А, приведенной выше, может быть получен при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Схема 1



Липид А, где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой низший алкил или  $R^3$  и  $R^4$  могут быть соединены с образованием необязательно замещенного гетероциклического кольца, можно получить согласно схеме 1. Кетон 1 и бромид 2 можно приобрести или получить согласно способам, известным обычному специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно превратить в соответствующую аммонийную соль при помощи органической соли формулы 5, где X представляет собой анионный противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.

Схема 2



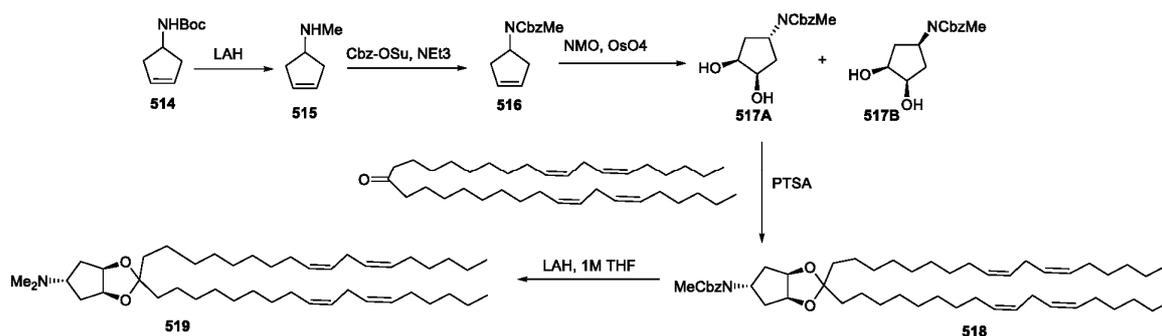
В качестве альтернативы, исходный материал в виде кетона 1 можно получить согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 можно приобрести или получить согласно способам, известным обычному специалисту в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А является таким, как описано на схеме 1.

#### Синтез МСЗ.

Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) представляло собой следующее. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиноасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный раствор бикарбоната натрия. Органические фракции сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и удаляли растворитель при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (20 г) с применением градиента элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и удаляли растворитель с получением бесцветного масла (0,54 г).

Синтез ALNY-100.

Синтез кетала 519 [ALNY-100] осуществляли с использованием следующей схемы 3:



Синтез 515.

К перемешанной суспензии  $\text{LiAlH}_4$  (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного THF в двухгорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл THF при  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После завершения добавления реакцию смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до температуры возврата флегмы в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и гасили при помощи аккуратного добавления насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч. при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl, и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO, 400 МГц):  $\delta=9,34$  (br, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двухгорлой RBF добавляли  $\text{NEt}_3$  (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилокси-карбонил)-сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч, определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно 1 н. раствором HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (1×50 мл). Органический слой затем высушивали над безводн.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель выпаривали с получением неочищенного материала, который очищали при помощи колоночной хроматографии с силикагелем с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц):  $\delta=7,36$ -7,27(m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br., 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60(m, 2H), 2,30-2,25(m, 2H). LC-MS  $[M+H]^+$  - 232,3 (96,94%).

Синтезы 517A и 517B.

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе из 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора  $\text{OsO}_4$  (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч.) смесь гасили при помощи добавления твердого  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (1×50 мл), водой (1×30 мл) и в конце соляным раствором (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: -6 г неочищенного продукта.

517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%).  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMSO, 400 МГц):  $\delta=7,39$ -7,31 (m, 5H), 5,04(s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47(d, 2H), 3,94-3,93(m, 2H), 2,71(s, 3H), 1,72-1,67(m, 4H). LC-MS -  $[M+H]^+$ -266,3,  $[M+NH_4]^+$ -283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

Синтез 518.

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц):  $\delta=7,35$ -7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (br m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65%.

Общая процедура для синтеза соединения 519.

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору ЛАН в THF (1 М, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при  $40^\circ\text{C}$  в течение 0,5 ч, затем опять охлаждали на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизуют насыщенным водным

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. <sup>13</sup>C ЯМР δ=130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2), 27,2 (×3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; MS с электрораспылением (+ve): молекулярный вес для C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экстракции, можно характеризовать одинаковым образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Они должны представлять собой белесые прозрачные растворы, в которых нет агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размеру липидных наночастиц можно измерять при помощи рассеяния света с применением, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц должен составлять приблизительно 20-300 нм, например 40-100 нм. Распределение частиц по размеру должно быть одновершинным. Общую концентрацию dsRNA в составе, а также захваченную фракцию определяют при помощи анализа с исключением красителя. Образец составленной dsRNA можно инкубировать со связывающимся с РНК красителем, например Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или при отсутствии разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например 0,5% Triton-X100. Общую dsRNA в составе можно определять по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по отношению к калибровочной кривой.

Захваченную фракцию определяют путем вычитания содержания "свободной" dsRNA (которое измерено по сигналу при отсутствии поверхностно-активного вещества) из общего содержания dsRNA. Процент захваченной dsRNA, как правило, составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от приблизительно по меньшей мере 50 нм до приблизительно по меньшей мере 110 нм, от приблизительно по меньшей мере 60 нм до приблизительно по меньшей мере 100 нм или от приблизительно по меньшей мере 80 нм до приблизительно по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Необходимыми могут быть загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления пероральные составы 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-дигидрофузидат 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, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-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 полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, 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 поли-аминокислоты; 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, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(альбумин изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE- и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их по-

лучение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, 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 согласно 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 согласно 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). Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или мелкоизмельченными твердыми носителями или теми, и другими, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в любой из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, пластичные гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. 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.

#### C. Дополнительные составы.

##### i. Эмульсии.

Композиции согласно 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 часто 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 мелкораспыленной 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 мелкораспыленной 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 вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое 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 o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью либо ее отсутствием. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза 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 высокодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> 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 их рассматривали в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> 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 часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидролипидным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионные, 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 (8<sup>th</sup> 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 составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные базы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий w/o, при этом сохраняя свою полутвердую консистенцию. Мелкоизмельченные 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, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерил тристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий, и, тем самым, они улучшают свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры, 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 крепких межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в составы эмульсий, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные соли аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют к составам эмульсий для предупреждения разрушения состава. Используемые антиоксиданты могут быть ловушками 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 составов эмульсий 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 (8<sup>th</sup> 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). Составы эмульсий 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 and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> 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; Idson в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and 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 являются одними из материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий o/w.

ii. Микроэмульсии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции 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 (8<sup>th</sup> 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 представляют собой системы, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи с получением 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. То, 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, p. 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 (8<sup>th</sup> 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 стабилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически устойчивых капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (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 среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения 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 без ограничения материалы, такие как Carptex 300, Carptex 355, Carptex MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерилы, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные 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 o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патент 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 при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий согласно 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 согласно 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 согласно настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях согласно 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 был рассмотрен выше.

#### iii. Микрочастицы.

Средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдосжиженном 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 способствованию 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 ниже более подробно.

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 абсорбция iRNA через слизистую повышается. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и 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, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рациглицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C<sub>1-20</sub>алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, мирилат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см. например, Touitou, E., et al., *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in 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 абсорбции 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*, 9<sup>th</sup> 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, выражение "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), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат (STDHF) натрия, гликоди-гидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (ПОЕ) (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*, 18<sup>th</sup> 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 абсорбция iRNA через слизистую повышается. 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 двунариевый 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, способствующих проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют меньшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацико-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 усиливают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям согласно 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 клеточное поглощение dsRNA. 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 Per-

Fectin (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 усиления 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 согласно настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Как используется в данном документе, выражения "соединение-носитель" или "носитель" могут означать нуклеиновую кислоту или ее аналог, 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, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, перерабатываемой печенью, почками или другими внесосудистыми депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, переработка частично фосфоротиоатной dsRNA тканью печени может быть снижена при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоциано-стильбен-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 металла, 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.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не реагируют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного применения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, 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 согласно 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 до-

полнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления композиций согласно настоящему изобретению в различных лекарственных формах, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако, такие материалы при добавлении не должны чрезмерно вступать в конфликт с биологическими активностями компонентов композиций согласно 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 оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой(нуклеиновыми) кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, 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, представляющих собой iRNA, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от iRNA, и которые пригодны 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, пригодные 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 между токсичным и терапевтическим эффектом является терапевтическим индексом, и его можно выражать как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно применять при составлении ряда 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 применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов клеточных культур. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентраций соединения, циркулирующих в плазме, или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC<sub>50</sub> (т.е. концентрацию испытываемого соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное подавление симптомов), которую определяют в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнении к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией КНК. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

#### VII. Способы согласно изобретению.

Настоящее изобретение предусматривает способы терапии и профилактики, которые включают введение субъекту с заболеванием, ассоциированным с КНК, нарушением и/или состоянием (например, заболеванием печени (например, жировым перерождением печени, стеатогепатитом), дислипидемией (например, гиперлипидемией, высоким уровнем холестерина LDL, низким уровнем холестерина HDL, гипертриглицеридемией, постпрандиальной гипертриглицеридемией), нарушениями гликемического контроля (например, инсулинорезистентностью, диабетом), сердечно-сосудистым заболеванием (например, гипертензией, дисфункцией эндотелиальных клеток), заболеванием почек (например, острым нарушением функции почек, канальцевой дисфункцией, провоспалительными изменениями проксимальных канальцев), метаболическим синдромом, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира,

ожирением, гиперурикемией, подагрой, расстройствами пищевого поведения и чрезмерным пристрастием к сахару или со склонностью к их развитию средства на основе iRNA, фармацевтических композиций, содержащих средство на основе iRNA, или вектора, содержащего iRNA, согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта с нарушением, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК, например заболеванием, ассоциированным с КНК, например заболеванием печени (например, жировым перерождением печени, стеатогепатитом), дислипидемией (например, гиперлипидемией, высоким уровнем холестерина LDL, низким уровнем холестерина HDL, гипертриглицеридемией, постпрандиальной гипертриглицеридемией), нарушениями гликемического контроля (например, инсулинорезистентностью, диабетом), сердечно-сосудистым заболеванием (например, гипертензией, дисфункцией эндотелиальных клеток), заболеванием почек (например, острым нарушением функции почек, канальцевой дисфункцией, провоспалительными изменениями проксимальных канальцев), метаболическим синдромом, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением, гиперурикемией, подагрой, расстройствами пищевого поведения и чрезмерным пристрастием к сахару. Способы лечения (и применения) согласно настоящему изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген КНК, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген КНК, осуществляя, таким образом, лечение субъекта с нарушением, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК, например, заболеванием, ассоциированным с КНК, например, заболеванием печени (например, жировым перерождением печени, стеатогепатитом), дислипидемией (например, гиперлипидемией, высоким уровнем холестерина LDL, низким уровнем холестерина HDL, гипертриглицеридемией, постпрандиальной гипертриглицеридемией), нарушениями гликемического контроля (например, инсулинорезистентностью, диабетом), сердечно-сосудистым заболеванием (например, гипертензией, дисфункцией эндотелиальных клеток), заболеванием почек (например, острым нарушением функции почек, канальцевой дисфункцией, провоспалительными изменениями проксимальных канальцев), метаболическим синдромом, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением, гиперурикемией, подагрой, расстройствами пищевого поведения и чрезмерным пристрастием к сахару. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, например, dsRNA, вектора согласно настоящему изобретению, предупреждая, таким образом, по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК. Например, настоящее изобретение предусматривает способы предупреждения липогенеза и/или гиперурикемии у субъекта, страдающего от нарушения, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает применения терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, который будет испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает применения средства на основе iRNA, например, dsRNA, согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген КНК, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген КНК, в получении лекарственного препарата для лечения субъекта, например, субъекта, который будет испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, такого как субъект с нарушением, которое будет облегчаться в результате снижения экспрессии КНК, например заболеванием, ассоциированным с КНК, например заболеванием печени (например, жировым перерождением печени, стеатогепатитом), дислипидемией (например, гиперлипидемией, высоким уровнем холестерина LDL, низким уровнем холестерина HDL, гипертриглицеридемией, постпрандиальной гипертриглицеридемией), нарушениями гликемического контроля (например, инсулинорезистентностью, диабетом), сердечно-сосудистым заболеванием (например, гипертензией, дисфункцией эндотелиальных клеток), заболеванием почек (например, острым нарушением функции почек, канальцевой дисфункцией, провоспалительными изменениями проксимальных канальцев), метаболическим синдромом, дисфункцией адипоцитов, отложением висцерального жира, ожирением, гиперурикемией, подагрой, расстройствами пищевого поведения и чрезмерным пристрастием к сахару.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает применения iRNA, например, dsRNA, согласно настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, которое будет облегчаться в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, такого как заболевание, ассоциированное с КНК, например, заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемия, постпрандиальная

гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в получении лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, которое будет облегчаться в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, такого как заболевание, ассоциированное с КНК, например, заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеатогепатит), дислипидемия (например, гиперлипидемия, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемия, постпрандиальная гипертриглицеридемия), нарушения гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет), сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензия, дисфункция эндотелиальных клеток), заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевая дисфункция, провоспалительные изменения проксимальных канальцев), метаболический синдром, дисфункция адипоцитов, отложение висцерального жира, ожирение, гиперурикемия, подагра, расстройства пищевого поведения и чрезмерное пристрастие к сахару.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на КНК, вводят субъекту с заболеванием, ассоциированным с КНК, так, что уровни КНК, например, в клетке, ткани, крови или других тканях или жидкостях субъекта, снижаются по меньшей мере на приблизительно

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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%,  
47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%,  
62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%,  
79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,  
95%, 96%, 97%, 98%,

или по меньшей мере на приблизительно 99% или более при введении средства на основе dsRNA субъекту.

Способы и применения согласно настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, так, что экспрессия целевого гена КНК понижается, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или на приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена КНК понижается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре, пять, шесть, семь дней или дольше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или на приблизительно четыре недели или дольше.

Введение dsRNA в соответствии со способами и применениями согласно настоящему изобретению может приводить в результате к снижению тяжести, ослаблению выраженности признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, ассоциированным с КНК. Под "снижением" в данном контексте подразумевает статистически значимое снижение такого уровня. Снижение, например, может быть по меньшей мере на приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или на приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего данному заболеванию, лечение которого осуществляется или предупреждение которого предусматривается. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров относится к компетенции специалиста в данной области. Например, эффективность лечения дислипидемии можно оценить, например, с помощью периодического контроля уровней холестерина LDL, холестерина HDL и триглицеридов. В дополнительном примере эффективность лечения нарушения глюкозного контроля можно оценить, например, с помощью периодического контроля уровней инсулина и глюкозы. В другом примере эффективность лечения ожирения можно оценить, например, с помощью периодического контроля индекса массы тела. В еще одном примере эффективность лечения гипертензии можно оценить, например, с помощью периодического контроля кровяного давления. При помощи сравнения последующих данных с исходными данными врач получает показатель того, является ли лечение эффективным. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров относится к

компетенции специалиста в данной области. Применительно к введению iRNA, целенаправленно воздействующей на КНК, или фармацевтической композиции с ней, "эффективная в отношении" заболевания, ассоциированного с КНК, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит в результате к благоприятному эффекту по меньшей мере у статистически значимой доли пациентов, такому как ослабление симптомов, излечение, снижение степени заболевания, продление продолжительности жизни, улучшение качества жизни, или другому эффекту, обычно считающемуся положительным врачом, знакомым с лечением заболевания, ассоциированного с КНК, и подобными случаями.

Лечебный или предупредительный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20%, на 30%, на 40%, на 50% или более может служить показателем эффективного лечения. Об эффективности данного лекарственного средства на основе iRNA или состава с таким лекарственным средством можно также судить при помощи экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна из уровня техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения доказана, если наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

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, 1,3 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 подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления, например, где композиция согласно настоящему изобретению содержит dsRNA, которая описана в данном документе, и липид, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг, от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 3,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 4 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 5,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 6,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 7,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 8,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от приблизительно 9 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 9,5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.



приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления, где композиция согласно настоящему изобретению содержит dsRNA, которая описана в данном документе, и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить терапевтическое количество от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, как, например, 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, 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 подразумеваются как часть настоящего изобретения.

iRNA 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, 21, 22, 23, 24, или приблизительно 25 мин. Введение можно повторять, например, регулярно, как, например, раз в неделю, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После осуществления схемы первичного лечения лекарственные препараты можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Введение iRNA может снижать уровни КНК, например, в клетке, ткани, крови, моче или других участках пациента, по меньшей мере на приблизительно

5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

или по меньшей мере на приблизительно 99% или более.

Перед введением полной дозы iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, 5% инфузию и наблюдать их в отношении отрицательного эффекта, как, например, аллергических реакций. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, как, например, повышенных уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Благодаря ингибирующему эффекту в отношении экспрессии КНК, композиция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, полученная из нее, могут повышать качество жизни.

iRNA согласно настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированное или немодифицированное средство на основе iRNA суспендируют непосредственно в водном или подходящем буферном растворе, в виде "свободной iRNA." Свободную iRNA вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Свободная iRNA может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего iRNA, можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, iRNA согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав с dsRNA.

Субъекты, которые будут испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии гена КНК, представляют собой таковых с заболеванием, ассоциированным с КНК, или нарушением, которое описано в данном документе. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет заболевание печени (например, жировое перерождение печени, стеато-

гепатит). В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет дислипидемию (например, гиперлипидемию, высокий уровень холестерина LDL, низкий уровень холестерина HDL, гипертриглицеридемию, постпрандиальную гипертриглицеридемию). В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет нарушение гликемического контроля (например, инсулинорезистентность, диабет). В еще одном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет сердечно-сосудистое заболевание (например, гипертензию, дисфункцию эндотелиальных клеток). В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет заболевание почек (например, острое нарушение функции почек, канальцевую дисфункцию, провоспалительные изменения проксимальных канальцев). В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет метаболический синдром. В конкретном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет дисфункцию адипоцитов. В еще одном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет отложение висцерального жира. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет ожирение. В конкретном варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет гиперурикемию. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет подагру. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, ассоциированным с КНК, имеет расстройство пищевого поведения и/или чрезмерное пристрастие к сахару.

Лечение субъекта, который будет испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, включает лечение в терапевтических и профилактических целях.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы и применения средства на основе iRNA или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, который будет испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с КНК, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными способами терапии, такими как, например, те, которые в настоящее время применяют для лечения таких нарушений. Например, в определенных вариантах осуществления iRNA, целенаправленно воздействующую на КНК, вводят в комбинации, например, со средством, пригодным для лечения заболевания, ассоциированного с КНК, которое описано в другом месте в данном документе. Например, дополнительные терапевтические препараты и способы терапии, подходящие для лечения субъекта, который будет испытывать облегчение в результате снижения и/или ингибирования экспрессии КНК, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с КНК, включают ингибитор HMG-CoA-редуктазы, средства для терапии диабета, гипотензивное лекарственное средство, ресвератрол или другие терапевтические средства для лечения заболевания, ассоциированного с КНК. Иллюстративные ингибиторы редуктазы HMG-CoA включают аторвастатин (Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl от Pfizer), правастатин (Pravachol от Bristol-Myers Squibb, Mevalotin/Sanaprav от Sankyo), симвастатин (Zocor®/Sinvacog от Merck, Denan от Boehringer Ingelheim, Lipovas от Banyu), ловастатин (Mevacog/Mevinacog от Merck, Lovastatina от Bexal, Liposcler от Cera Schwarz Pharma), флувастатин (Lescol®/Locol/Lochol от Novartis, Cranoc от Fujisawa, Digaril от Solvay), церивастатин (Lipobay от Bayer/Baycol от GlaxoSmithKline), розувастатин (Crestor® от AstraZeneca) и питивастатин (итавастатин/ризивастатин) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo и Novartis). Иллюстративные средства для терапии диабета известны из уровня техники и включают, например, усилители чувствительности рецепторов к инсулину, такие как бигуаниды (например, метформин) и тиазолидиндионы (например, росиглитазон, пиоглитазон, троглитазон); средства, усиливающие секрецию, такие как сульфонилмочевины (например, глибурид, глипизид, глимепирид, толбутамид, ацетогексамид, толазамид, хлорпропамид, гликлазид, гликопирамид, гликвидон), средства, усиливающие секрецию, отличные от сульфонилмочевин, например, производные меглитинида (например, репаглинид, натеглинид); ингибиторы дипептидилпептидазы IV (например, ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, вилдаглиптин, алоглиптин, септаглиптин); ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, миглитол, воглибоза); амилиномиметики (например, прамлинтида ацетат); миметики инкртина (например, эксенатид, лираглутид, таспоглутид); инсулин и его аналоги (например, быстродействующий, медленнодействующий и действующий со средней скоростью); секвестранты желчных кислот (например, колесевелам) и агонисты допамина (например, бромкриптин), взятые отдельно или в комбинации. Иллюстративные гипотензивные лекарственные средства известны из уровня техники и включают диуретики (например, тиазидные диуретики (например, хлортиазид, хлорталидон, гидрохлортиазид, индапамид, металозон), петлевые диуретики (например, буметанид, этакриновую кислоту, фуросемид, торасемид) и калийсберегающие диуретики/блокаторы альдостеронового рецептора (например, амилорид, спиронолактон, триамтерен, эплеренон)), лекарственные средства к адреналину (например, бета-блокаторы (например, ателолол, метопролол, метопролол пролонгированного действия, небиволол, надолол, пиндолол, пропранолол, соталол, тимолол), альфа-1-блокаторы (например, доксазозин, празозин, теразозин), альфа- и бета-блокаторы (например, карведилол, лабеталол), средства центрального действия (например, клонидин, метилдопа), средства, воздействующие на периферическую нервную систему (например, гуанетидин, резерпин) и

вазодилаторы непосредственного действия (например, гидралазин, миноксидил)), блокаторы кальциевых каналов (например, амлодипин, дилтиазем, фелодипин, исрадипин, никардипин, нифедипин, верапамил), ингибиторы АПФ (например, беназеприл, каптоприл, эналаприл, фозиноприл, лизиноприл, хинаприл, рамиприл), блокаторы ангиотензиновых рецепторов (например, кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лозартан, олмесартан, телмисартан, валсартан) или любые их комбинации.

Средство на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство и/или лекарственный препарат можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области или описанным в данном документе.

Настоящее изобретение также предусматривает способы применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению, для снижения и/или ингибирования экспрессии КНК в клетке. В других аспектах настоящее изобретение предусматривает iRNA согласно настоящему изобретению и/или композицию, содержащую iRNA согласно настоящему изобретению, для применения в снижении и/или ингибировании экспрессии КНК в клетке. В еще одних аспектах предусмотрено применение iRNA согласно настоящему изобретению и/или композиции, содержащей iRNA согласно настоящему изобретению, для получения лекарственного препарата для снижения и/или ингибирования экспрессии КНК в клетке.

Способы и применения включают приведение клетки в контакт с iRNA, например, dsRNA, согласно настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения транскрипта mRNA гена КНК, ингибируя тем самым экспрессию гена КНК в клетке.

Снижение экспрессии гена можно оценить любыми способами, известными в данной области. Например, снижение экспрессии КНК можно определить путем определения уровня экспрессии mRNA КНК с помощью способов, обычных для специалиста в данной области, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка КНК с помощью способов, обычных для специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, способы проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности КНК (например, фосфорилирования фруктозы до фруктозо-1-фосфата). В одном варианте осуществления снижение экспрессии гена КНК можно определить путем измерения уровня фруктозы в моче.

В способах и применениях согласно настоящему изобретению клетка может находиться в контакте *in vitro* или *in vivo*, т.е. клетка может находиться в субъекте.

Клеткой, подходящей для лечения с помощью способов согласно настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген КНК. Клетка, подходящая для применения в способах и применениях согласно настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или отличного от человека примата, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетку отличного от примата животного (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кота, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клеткой является клетка человека, например, клетка печени человека.

Экспрессию КНК можно ингибировать в клетке по меньшей мере на приблизительно  
 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%,  
 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%,  
 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%,  
 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%,  
 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%,  
 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,  
 99%,  
 или на приблизительно 100%.

*In vivo* способы и применения согласно настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей iRNA, где iRNA включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части транскрипта РНК гена КНК млекопитающего, подлежащего лечению. В тех случаях, когда организмом, подлежащим лечению является человек, тогда композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области, в том числе, без ограничения, подкожным, внутривенным, пероральным, внутривнутрибрюшинным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекральное), внутримышечное, трансдермальное, через верхние дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и сублингуальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят при помощи подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. Благодаря инъекции депо-препарата iRNA может постоянно высвобождаться в течение длительного периода времени. Таким образом инъекция депо-препарата может снижать частоту введения доз, необходимых для получения необходимого эффекта, например, необходимого уровня ингибирования КНК, или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке. Инъекции депо-препарата могут предусматривать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции.

В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является имплантированным хирургическим путем насосом, который доставляет средство на основе iRNA в печень.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для увеличения целенаправленного воздействия.

В одном аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы ингибирования экспрессии гена КНК у млекопитающего, например, человека. Настоящее изобретение также предусматривает композицию, содержащую iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген КНК в клетке млекопитающего, для применения в ингибировании экспрессии гена КНК у млекопитающего. В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает применение iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген КНК в клетке млекопитающего, в получении лекарственного препарата для ингибирования экспрессии гена КНК у млекопитающего.

Способы и применения предусматривают введение млекопитающему, например, человеку, композиции, содержащей iRNA, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген КНК в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для обеспечения разрушения транскрипта mRNA гена КНК, ингибируя тем самым экспрессию гена КНК у млекопитающего.

Снижение экспрессии гена можно оценивать в образце периферической крови субъекта, которому вводят iRNA, с помощью любых способов, известных из уровня техники, например, qRT-PCR, описанной в данном документе. Снижение выработки белка можно оценивать с помощью любых способов, известных из уровня техники, и с помощью способов, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления биопсийный образец печени, полученный при помощи прокола, служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена КНК и/или белка. В другом варианте осуществления образец крови служит в качестве тканевого материала для контроля снижения экспрессии гена КНК и/или белка.

В одном варианте осуществления подтверждение RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения средства на основе iRNA осуществляют путем выполнения 5'-RACE или модификаций протокола, известного из уровня техники (Lasham A et al. (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann et al. (2006) *Nature* 441: 111-4).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или испытании iRNA и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, которые упоминаются в данном документе, включены при помощи ссылки во всей своей полноте. В случае противоречия настоящее описание, в том числе определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

### Примеры

Пример 1. Синтез iRNA.

Источники получения реагентов.

Если источник получения реагента конкретно не приведен в данном документе, такой реагент можно получать от любого поставщика реагентов для целей использования в молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Подробный перечень последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для КНК приведен в табл. 3-5.

Транскрипты.

Конструирование siRNA выполняли для идентификации siRNA, нацеливающихся на транскрипты КНК человека, макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*; в дальнейшем "супо"), мыши и крысы, аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). При конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции эталонных последовательностей в NCBI: человека - XM\_005264298.1; супо - XM\_005576324.1; мыши - NM\_008439.3; крысы - NM\_031855.3. Вследствие высокой дивергенции последовательностей примата/грызуна дуплексы siRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, включая, без ограничения, партии, содержащие дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и супо; только транскриптам человека, супо и мыши и только транскриптам человека, супо, мыши и крысы. Большинство дуплексов siRNA конструировали так, чтобы они имели 100% идентичность в предусмотренном участке с приведенными транскриптом человека и транскриптами других видов, рассматриваемыми в каждой конструируемой партии (выше). В некоторых случаях ошибки спаривания между дуплексом и целевой mRNA допускались в первом антисмысловом (последнем смысловом) положении, в тех случаях, если комплементарной парой оснований антисмысловой нити целевой mRNA была пара GC или CG. В этих случаях дуплексы конструировали с парами UA или AU в качестве первой антисмысловой:последней смысловой пары. Таким образом, дуплексы сохраняли комплементарность, но являлись несовпадающими по отношению к мишени (U:C, U:G, A:C или A:G).

Конструирование siRNA, прогноз специфичности и эффективности.

Специфичность всех возможных олигомеров из 19 нуклеотидов прогнозировали из каждой последовательности. Затем отбирали кандидатные олигомеры из 19 нуклеотидов, у которых отсутствовали повторения длиннее 7 нуклеотидов. Эти siRNA, 476 кандидатных человека/супо, 71 человека/супо/мыши и 58 человека/супо/мыши/крысы, использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптом (определенные как набор из записей NM\_ и XM\_ в пределах наборов эталонных последовательностей человека, супо, мыши или крысы в NCBI) с применением алгоритма полного перебора всевозможных вариантов, включенного в скрипт python 'BruteForce.py'. Скрипт затем разбирает выравнивания транскрипт-олигомер с получением балла, основанного на положении и количестве ошибок спаривания между siRNA и любым потенциальным 'нецелевым' транскриптом. 'Нецелевой' балл взвешивали для усиления различий в 'затравочном' участке siRNA в положениях 2-9 от 5'-конца молекулы. Каждой паре олигомер-транскрипт из полного перебора присваивали балл за ошибки спаривания путем суммирования отдельных баллов за ошибки спаривания; ошибки спаривания в положениях 2-9 определяли как 2,8, ошибки спаривания в положениях сайта расщепления 10-11 определяли как 1,2 и ошибки спаривания в участке 12-19 определяли как 1,0. Дополнительное нецелевое прогнозирование выполняли путем сравнения встречаемости гептамеров и октамеров, полученных из 3 отличных полученных из затравки гексамеров каждого олигомера. Гексамеры из положений 2-7 по отношению к 5'-началу применяли для создания 2 гептамеров и одного октамера. Гептамер1 создавали путем добавления A на 3'-конец гексамера; гептамер2 создавали путем добавления A на 5'-конец гексамера; октамер создавали путем добавления A как на 5'-конец, так и на 3'-конец гексамера. Предварительно рассчитывали встречаемость октамеров и гептамеров в 3'UTRome человека, супо, мыши или крысы (определенные как подпоследовательности транскриптом из базы данных эталонных последовательностей в NCBI, где конец кодирующего участка, 'CDS', является четко определенным). Встречаемость октамеров нормализовали по отношению к встречаемости гептамеров с использованием медианного значения из диапазона встречаемостей октамеров. Затем вычисляли 'mirSeedScore' путем вычисления суммы ((3×нормализованное подсчитанное число для октамеров)+(2×подсчитанное число для гептамер2)+(1×подсчитанное число для гептамер1)).

Обоим нитям siRNAs присваивали категорию специфичности согласно рассчитанным баллам: балл выше 3 оценивали как высоко специфичная, равный 3 как специфичная и от 2 до 2,8 оценивали как умеренно специфичная. Нити siRNA упорядочивали по специфичности антисмысловой нити. Авторы данной заявки отбирали умеренно (или более высоко) специфичные дуплексы, антисмысловые олигонуклеотиды которых обладали характеристиками дуплексов с высокой прогнозированной эффективностью, включая максимальное содержание UA в затравочном участке и общее низкое содержание GC. Также включали один дополнительный дуплекс с 'антисмысловым' баллом 1,2 у крыс (но  $\geq 2$  у других видов).

Кандидатные конъюгированные с GalNaC дуплексы, длиной 21 и 23 нуклеотида для смысловой и антисмысловой нитей соответственно, конструировали путем удлинения антисмысловых олигомеров из 19 нуклеотидов (описанные выше) до 23 нуклеотидов комплементарной целевой последовательности. Все транскрипты видов, включенных в партии конструирования, проверяли на комплементарность. Для каждого дуплекса смысловой олигонуклеотид из 21 нуклеотида описывали как обратную комплементарную последовательность первых 21 нуклеотида антисмысловой нити.

Отбор последовательностей siRNA.

В общей сложности синтезировали 21 смысловую и 21 антисмысловую нитей siRNA из 21/23 нуклеотидов, происходящих от человека/супо/мыши/крысы (табл. 3), 29 смысловых и 29 антисмысловых нитей siRNA из 21/23 нуклеотидов, происходящих от человека/супо (табл. 4), а также 3 смысловые и 3 антисмысловые нитей siRNA из 21/23 нуклеотидов, происходящих от человека/супо/мыши (табл. 5).

Синтез siRNA.

Общие процедуры синтеза РНК в малом и среднем масштабе.

Олигонуклеотиды РНК синтезировали в масштабах 0,2-500 мкмоль с применением коммерчески доступных 5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-О-трет-бутилдиметилсилил-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил)фосфорамидитных мономеров уридина, 4-N-ацетилцитидина, 6-N-бензоиладенозина и 2-N-изобутирилгуанозина и соответствующих 2'-О-метил- и 2'-фторфосфорамидитов в соответствии со стандартными протоколами твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Растворы амидитов получали в концентрации 0,1-0,15 М, и при этом в качестве активатора применяли 5-этилтио-1Н-тетразол (0,25-0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные модификации остова вводили в ходе синтеза с применением 0,2 М фефилацетилдисульфида (PADS) в лугидине:ацетонитриле (1:1) (об.:об.) или 0,1 М 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тиона (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза последовательности отщепляли от твердой подложки и снимали защиту при помощи метиламина с последующим триэтиламин.3НР для удаления любых присутствующих 2'-О-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп.

Для синтеза в масштабе 5-500 мкмоль и полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинаций) с олигонуклеотидов снимали защиту с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака либо при 35°C в течение 16 ч, либо при 55°C в течение 5,5 ч. Перед снятием защиты с применением аммиака олигонуклеотиды обрабатывали 0,5 М пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин. на твердой подложке. Неочищенные олигонуклеотиды анализировали при помощи LC-MS и анионообменной HPLC (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов осуществляли при помощи IEX HPLC с применением: 20 мМ фосфата, 10% -15% ACN, pH=8,5 (буфер А) и 20 мМ фосфата, 10% -15% ACN, 1 М NaBr, pH=8,5 (буфер В). Анализировали чистоту фракций при помощи аналитической HPLC. Фракции, содержащие продукт, с подходящей чистотой объединяли и концентрировали на роторном испарителе перед обессоливанием. Образцы обессоливали при помощи эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Осуществляли гибридизацию равных молярных количеств смысловых и антисмысловых нитей в 1× буфере PBS с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Синтез в небольшом масштабе (0,2-1 мкмоль) осуществляли на синтезаторе MerMade 192 в 96-луночном формате. В случае полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинаций) с олигонуклеотидов снимали защиту с применением метиламина при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 60°C в течение 30 мин или с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 40°C в течение 1,5 ч. Неочищенные олигонуклеотиды затем осаждали в растворе ацетонитрил:ацетон (9:1) и выделяли посредством центрифугирования и декантирования супернатанта. Осадок неочищенных олигонуклеотидов ресуспендировали в 20 мМ буфере NaOAc и анализировали при помощи LC-MS и анионообменной HPLC. Неочищенные олигонуклеотидные последовательности обессоливали в глубоких 96-луночных планшетах на 5 мл колонке HiTrap Sephadex G25 (GE Healthcare). Из каждой лунки отбирали 1,5 мл образцов, соответствующих индивидуальной последовательности. Эти очищенные обессоленные олигонуклеотиды анализировали при помощи LC-MS и анионообменной хроматографии. Дуплексы получали путем гибридизации эквимольных количеств смысловых и антисмысловых последовательностей при помощи автоматического устройства Тесап. Концентрацию дуплексов доводили до 10 мкМ в буфере 1× PBS.

Синтез олигонуклеотидов, конъюгированных с GalNAc, для *in vivo* анализа Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандом GalNAc на их 3'-конце, синтезировали в масштабе 0,2-500 мкмоль с применением твердой подложки, предварительно загруженной Y-образным линкером, несущим защищенную 4,4'-диметокситритилом (DMT) первичную гидроксильную группу для синтеза олигонуклеотидов, и лигандом GalNAc, прикрепленным посредством связывающего фрагмента.

Для синтеза конъюгатов с GalNAc в масштабе 5-500 мкмоль следовали вышеизложенному протоколу синтеза РНК со следующими модификациями. В случае подложек для синтеза на основе полистирола применяли 5% дихлоруксусную кислоту в толуоле для расщепления DMT в ходе синтеза. Отщепление от подложки и снятие защиты осуществляли так, как описано выше. Последовательности, богатые фосфоротиоатами (обычно >5 фосфоротиоатов), синтезировали без удаления концевой группы 5'-DMT ("с DMT") и после отщепления и снятия защиты, как описано выше, очищали при помощи обращенно-фазовой HPLC с применением 50 мМ ацетата аммония в воде (буфер А) и 50 мМ ацетата аммония в 80% ацетонитриле (буфер В). Анализировали чистоту фракций при помощи аналитической HPLC и/или LC-MS. Фракции, содержащие продукт, с подходящей чистотой объединяли и концентрировали на роторном испарителе. DMT-группу удаляли с применением 20-25% уксусной кислоты в воде до завершения процесса. Образцы обессоливали при помощи эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Осуществляли гибридизацию равных молярных количеств смысловых и антисмысловых нитей в 1× буфере PBS с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для синтеза конъюгатов с GalNAc в небольшом масштабе (0,2-1 мкмоль), в том числе последовательностей с несколькими фосфоротиоатными связями, применяли протоколы, описанные выше для син-

теза РНК или последовательностей, полностью содержащих 2'-F/2'-OMe, на платформе MerMade. Синтез осуществляли на предварительно заполненных колонках, содержащих функционализированную GalNAc стеклянную подложку с регулируемыми порами.

Пример 2. Общий скрининг дуплексов siRNA in vitro.

In vitro эффективность дуплексов можно определять при анализах с однократной дозой в отношении любой экспрессии гена, целевой для RNAi, при помощи изложенных ниже способов. Аналогичные способы можно применять для анализов со множеством доз для определения зависимости эффекта от дозы дуплексов и вычисления  $IC_{50}$  дуплексов.

Культура клеток и трансфекции.

Клетки Hep3B (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной питательной среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Клетки промывали и ресуспендировали в концентрации  $0,25 \times 10^6$  клеток/мл. Во время трансфекций клетки высевали в 96-луночный планшет в количестве приблизительно 20000 клеток на лунку.

Первичные гепатоциты мышей (PMH) выделяли непосредственно перед процедурой из самок мышей линии C57BL/6 (Charles River Laboratories International, Inc. Уилмингтон, Массачусетс), меньше чем за 1 ч до трансфекций, и выращивали в среде для первичных гепатоцитов. Клетки ресуспендировали в концентрации  $0,11 \times 10^6$  клеток/мл в среде (для посева) InVitroGRO CP Rat (Celsis In Vitro Technologies, номер в каталоге S01494). Во время трансфекций клетки высевали в 96-луночный планшет с коллагеном BD BioCoat (BD, 356407) в количестве 10000 клеток на лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Криоконсервированные первичные гепатоциты Synomolgus (Celsis In Vitro Technologies, M003055-P) размораживали на водяной бане при 37°C непосредственно перед применением и ресуспендировали в количестве  $0,26 \times 10^6$  клеток/мл в среде (для посева) InVitroGRO CP (Celsis In Vitro Technologies, № по каталогу Z99029). Во время трансфекций клетки высевали в 96-луночный планшет с коллагеном BD BioCoat (BD, 356407) в количестве 25000 клеток на лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Для Hep3B, PMH и первичных гепатоцитов Synomolgus трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Восемьдесят мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих соответствующее число клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ для модифицированных GalNAc последовательностей или при конечной концентрации дуплекса 1 нМ и 0,01 нМ для всех остальных последовательностей. Эксперименты в отношении зависимости эффекта от дозы проводили при конечной концентрации дуплекса 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412 и 0,00137 нМ для первичных гепатоцитов мышей и при конечной концентрации дуплекса 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412, 0,00137, 0,00046, 0,00015, 0,00005 и 0,000017 нМ для клеток Hep3B.

Трансфекция посредством свободного поглощения.

Эксперименты по свободному поглощению выполняли путем добавления в 96-луночный планшет 10 мкл дуплексов siRNA в PBS на лунку. Десятью мкл полных питательных сред, содержащих соответствующее число клеток для типа клеток, затем добавляли к siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 500 нМ и 5 нМ, а эксперименты в отношении зависимости эффекта от дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 1000, 333, 111, 37, 12,3, 4,12, 1,37, 0,46 нМ.

Выделение общей РНК с применением набора для выделения mRNA на парамагнитных микрочастицах DYNABEADS (Invitrogen, номер по каталогу 610-12)

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и перемешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. И наконец, гранулы оставляли высыхать в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и перемешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли сорок пять мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Общий синтез cDNA с применением высокопроизводительного набора для обратной транскрипции cDNA ABI (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по каталогу 4368813).

Получали мастер-микс из 2 мкл 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию. Равные объемы мастер-микса и РНК смешивали до конечного объема 12 мкл для скрининга *in vitro* или 20 мкл для скрининга *in vivo* образцов. cDNA получали с применением термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) в результате следующих стадий: 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 120 мин, 85°C в течение 5 с и хранение при 4°C.

ПЦР в режиме реального времени.

Два мкл cDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 2 мкл H<sub>2</sub>O, 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Life Technologies, номер в каталоге 4326317E для клеток Hep3В, номер в каталоге 352339E для первичных гепатоцитов мыши, или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макака-крабоеда), 0,5 мкл зонда C5 TaqMan (Life Technologies, номер в каталоге Hs00156197\_m1 для клеток Hep3В или mm00439275\_m1 для первичных гепатоцитов мыши, или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макака-крабоеда) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, номер в каталоге 04887301001) на лунку в 384-луночные планшеты (Roche, номер в каталоге 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени "Roche LC480" (Roche) с применением ΔΔCt(RQ)-анализа. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс тестировали с двумя биологическими повторами, если не указано иное, и каждую в каждый раз ПЦР в реальном времени выполняли в одинаковых технических повторях. Для скрининга *in vivo* каждый дуплекс тестировали в одном или нескольких экспериментах (3 мыши на группу) и каждый раз ПЦР в реальном времени выполняли в одинаковых технических повторях.

Для расчета относительного кратного изменения уровней mRNA КНК данные в реальном времени анализировали с применением ΔΔCt-способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или модельно трансфицированными клетками. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с таковыми для клеток, трансфицированных AD-1955 в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

СМЫСЛОВАЯ: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:17)

АНТИСМЫСЛОВАЯ: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:18).

Таблица 2

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

<b>Сокращение</b>	<b>Нуклеотид(ы)</b>
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат

Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3

Таблица 3

## Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA КНК

Эталонная последовательность; соответствующее mRNA положение смысловой нити	Целевой сайт	Смысловая (5'-3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая (5'-3')	SEQ ID NO:
XM_005264298_816-838_s	816	UGUCAGCAAAGAUGUGGCCAA	19	UUGGCCACAUCUUGCUGACAAA	40
XM_005264298_504-526_s	504	AGAGAAGCAGAUCUGUGCGU	20	ACGCACAGGAUCUGCUUCUCUUC	41
XM_005264298_810-832_s	810	GGUGUUUGUCAGCAAAGAUGU	21	ACAUCUUGCUGACAAACACCAC	42
XM_005264298_651-673_s	651	GAUCCACAUUGAGGGCCGGA	22	UUCGCGCCUCAUGUGGAUCCA	43
XM_005264298_815-837_s	815	UUGUCAGCAAAGAUGUGGCCA	23	UGGCCACAUCUUGCUGACAAAC	44
XM_005264298_650-672_s	650	GGAUCCACAUUGAGGGCCGGA	24	UCCGGCCUCAUGUGGAUCCA	45
XM_005264298_510-532_s	510	GCAGAUCCUGUGCGUGGGGCU	25	AGCCCCACGCACAGGAUCUGCUU	46
XM_005264298_813-835_C21A_s	813	GUUUGUCAGCAAAGAUGUGGA	26	UCCACAUCUUGCUGACAAACAC	47
XM_005264298_505-527_G21A_s	505	GAGAAGCAGAUCUGUGCGUA	27	UACGCACAGGAUCUGCUUCUCUUC	48
XM_005264298_644-666_G21A_s	644	UCAAGUGGAUCCACAUUGAGA	28	UCUCAUUGUGGAUCCACUUGAAC	49
XM_005264298_648-670_G21A_s	648	GUGGAUCCACAUUGAGGGCCA	29	UGGCCUCAUUGUGGAUCCACUUC	50
XM_005264298_646-668_C21A_s	646	AAGUGGAUCCACAUUGAGGGA	30	UCCUCAUUGUGGAUCCACUUGA	51
XM_005264298_811-833_G21A_s	811	GUGUUUGUCAGCAAAGAUGUA	31	UACAUCUUGCUGACAAACACCA	52
XM_005264298_812-834_G21A_s	812	UGUUUGUCAGCAAAGAUGUGA	32	UCACAUCUUGCUGACAAACACC	53
XM_005264298_649-671_G21A_s	649	UGGAUCCACAUUGAGGGCCGA	33	UCGGCCUCAUUGUGGAUCCACUUC	54
XM_005264298_507-529_G21A_s	507	GAAGCAGAUCUGUGCGUGGA	34	UCCACGCACAGGAUCUGCUUCUC	55
XM_005264298_502-524_C21A_s	502	GAAGAGAAGCAGAUCUGUGA	35	UCACAGGAUCUGCUUCUCUCCA	56
XM_005264298_645-667_G21A_s	645	CAAGUGGAUCCACAUUGAGGA	36	UCCUCAUUGUGGAUCCACUUGAA	57
XM_005264298_647-669_C21A_s	647	AGUGGAUCCACAUUGAGGGCA	37	UGCCUCAUUGUGGAUCCACUUG	58
XM_005264298_503-525_G21A_s	503	AAGAGAAGCAGAUCUGUGCA	38	UGCACAGGAUCUGCUUCUCUCC	59
XM_005264298_506-528_G21A_s	506	AGAAGCAGAUCUGUGCGUGA	39	UCACGCACAGGAUCUGCUUCUCU	60

Таблица 4

## Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA КНК

Эталонная последовательность; соответствующее mRNA положение смысловой нити	Целевой сайт	Смысловая (5'-3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая (5'-3')	SEQ ID NO:
XM_005264298.1_593-615_s	593	GCCUGCCAGAUGUGUCUGCUA	61	UAGCAGACACAUCUGGCAGGCUC	90
XM_005264298.1_642-664_s	642	GUUCAAGUGGAUCCACAUUGA	62	UCAUUGUGGAUCCACUUGAACUG	91
XM_005264298.1_640-662_s	640	CAGUUCAAGUGGAUCCACAUU	63	AAUGUGGAUCCACUUGAACUGGG	92
XM_005264298.1_808-830_s	808	GUGGUGUUUGUCAGCAAAGAU	64	AUCUUUGCUGACAAACACCACGU	93
XM_005264298.1_643-665_G21A_s	643	UUCAAGUGGAUCCACAUUGAA	65	UUCAUUGUGGAUCCACUUGAACU	94
XM_005264298.1_806-828_G21U_s	806	ACGUGGUGUUUGUCAGCAAU	66	AUUUGCUGACAAACACCACGUCU	95
XM_005264298.1_641-663_G21A_s	641	AGUUCAAGUGGAUCCACAUUA	67	UAAUGUGGAUCCACUUGAACUGG	96
XM_005264298.1_877-899_s	877	UUGUAUGGUCGUGUGAGGAAA	68	UUUCCUCACACGACCAUACAAGC	97
XM_005264298.1_795-817_s	795	UGGCUACGGAGACGUGGUGUU	69	AACACCACGUCUCCGUAGCCAAA	98
XM_005264298.1_828-850_s	828	UGUGGCCAAGCACUUGGGGUU	70	AACCCCAAGUGCUUGGCCACAUC	99
XM_005264298.1_639-661_s	639	CCAGUUAAGUGGAUCCACAU	71	AUGUGGAUCCACUUGAACUGGGU	100
XM_005264298.1_804-826_s	804	AGACGUGGUGUUUGUCAGCAA	72	UUGCUGACAAACACCACGUCUCC	101
XM_005264298.1_555-577_s	555	GGUGGACAAGUACCCUAGGA	73	UCCUAGGGUACUUGUCCACCAG	102
XM_005264298.1_632-654_s	632	AUCUGACCCAGUUAAGUGGA	74	UCCACUUGAACUGGGUCAGAUA	103
XM_005264298.1_883-905_s	883	GGUCGUGUGAGGAAAGGGGCU	75	AGCCCCUUCUCACACGACCAU	104
XM_005264298.1_675-697_s	675	AUCGGAGCAGGUGAAGAUGCU	76	AGCAUCUUCACCGUCUCCGAUGC	105
XM_005264298.1_800-822_s	800	ACGGAGACGUGGUGUUUGUCA	77	UGACAAACACCACGUCUCCGUAG	106

XM_005264298.1_513-535_s	513	GAUCCUGUGCGUGGGGCUAGU	78	ACUAGCCCCACGCACAGGAUCUG	107
XM_005264298.1_875-897_s	875	GCUUGUAUGGUCGUGUGAGGA	79	UCCUCACACGACCAUACAAGCCC	108
XM_005264298.1_796-818_s	796	GGCUACGGAGACGUGGUGUUU	80	AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA	109
XM_005264298.1_891-913_s	891	GAGGAAAGGGGCGUGUCUUGU	81	ACAAGCACAGCCCCUUUCCUCAC	110
XM_005264298.1_624-646_s	624	GAAGGUUGAUCUGACCCAGUU	82	AACUGGGUCAGAUCAACCUUCUC	111
XM_005264298.1_552-574_s	552	CCUGGUGGACAAGUACCCUAA	83	UUAGGGUACUUGUCCACCAGGCU	112
XM_005264298.1_619-641_C21A_s	619	UUUGAGAAGGUUGAUCUGACA	84	UGUCAGAUCAACCUUCUCAAAGU	113
XM_005264298.1_628-650_G21A_s	628	GUUGAUCUGACCCAGUUCAAA	85	UUUGAACUGGGUCAGAUCAACCU	114
XM_005264298.1_873-895_G21A_s	873	GGGCUUGUAUGGUCGUGUGAA	86	UUCACACGACCAUACAAGCCCCU	115
XM_005264298.1_836-858_G21A_s	836	AGCACUUGGGGUUCCAGUCAAA	87	UUGACUGGAACCCCAAGUCUUG	116
XM_005264298.1_797-819_G21A_s	797	GCUACGGAGACGUGGUGUUUA	88	UAAACACCACGUCUCCGUAGCCA	117
XM_005264298.1_802-824_C21A_s	802	GGAGACGUGGUGUUUGUCAGA	89	UCUGACAAACACCACGUCUCCGU	118

Таблица 5

## Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нитей dsRNA КНК

Эталонная последовательность; соответствующее mRNA положение смысловой нити	Целевой сайт	Смысловая (5'-3')	SEQ ID NO:	Антисмысловая (5'-3')	SEQ ID NO:
XM_005264298.1_685-707_s	685	GUGAAGAUGCUGCAGCGGAUA	119	UAUCCGUCGAGCAUCUUCACCU	122
XM_005264298.1_687-709_s	687	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	120	UCUAUCCGUCGAGCAUCUUCAC	123
XM_005264298.1_686-708_G21A_s	686	UGAAGAUGCUGCAGCGGAUAA	121	UUAUCCGUCGAGCAUCUUCACC	124

Пример 3. Конструирование, синтез и скрининг *in vitro* дополнительных siRNA.

Конструирование siRNA.

Дополнительный набор siRNA, нацеленных на КНК человека, "кетогексокиназу (фруктокиназу)" (человека: ID эталонной последовательности в NCBI XM\_005264298; ID гена в NCBI: 3795), а также на ортологи КНК видов животных для исследования на токсикологию (макака-крабоеда: XM\_005545463; мышцы: NM\_008439; крысы, NM\_031855) конструировали при помощи сделанных по индивидуальному заказу скриптов R и Python. Эталонная последовательность mRNA человека XM\_005264298 имеет длину 2146 оснований. Обоснование и способ для конструирования siRNA представляет собой следующее: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной siRNA из 19 нуклеотидов от положения 501 по положение 2146 включительно (кодирующий участок и 3'-UTR) определяли при помощи линейной модели, полученной в результате непосредственных измерений нокдауна mRNA от более чем 20000 различных конструирований siRNA, нацеленных на большое количество генов позвоночных. Подмножества siRNA КНК конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями между видами: человек, макака-крабоед и грызун, а также подмножество, нацеленное только на последовательность человека или макака-крабоеда. Дополнительное подмножество конструировали с идеальными или почти идеальными совпадениями по отношению к ортологам КНК мышцы или крысы. Для каждой нити siRNA в полном переборе использовали сделанный по индивидуальному заказу скрипт Python для измерения количества и определения положений ошибок спаривания между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в транскрипте целевого вида. Дополнительные баллы присваивали за ошибки спаривания в затравочном участке, определенном в данном случае как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, равно как и в сайте расщепления siRNA, определенном в данном случае как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида. Относительный балл за ошибки спаривания составлял 2,8; 1,2: 1 для ошибок спаривания в затравочном участке, сайте расщепления и в других положениях вплоть до положения 19 антисмыслового олигонуклеотида. Ошибки спаривания в первом положении игнорировали. Балл за специфичность рассчитывали для каждой нити путем суммирования значений каждой взвешенной ошибки спаривания. Предпочтение отдавали тем siRNA, 'антисмысловый' балл которых для человека и макака-крабоеда составлял  $\geq 3,0$ , и прогнозируемая эффективность составляла  $\geq 70\%$  нокдауна транскрипта XM\_005264298.

Синтез.

Последовательности siRNA КНК синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (BioAutomation) с применением твердой подложки, опосредующей особенности фосфорамидатной химии. Твердая подложка представляла собой стеклянную подложку с регулируемым порами (500°А), нагруженную сделанным по индивидуальному заказу лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F- и 2'-O-метил-РНК и дезоксофосфорамидиты, получали от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGENE (Китай). 2'F, 2'-O-метил, РНК, ДНК и другие модифицированные нуклеозиды вводили в последовательности с применением соответствующих фосфорамидитов. Синтез отдельных нитей, конъюгированных с GalNAc по 3'-концу, выполняли на модифицированной GalNAc CPG подложке. Сделанную по индивидуальному заказу универ-

сальную твердую CPG подложку применяли для синтеза антисмысловых отдельных нитей. Время связывания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 мин с использованием 5-этилтио-1Н-тетразола (ЕТТ) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с применением 50 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученный 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 защиту в запечатанных планшетах с 96 глубокими лунками с помощью 200 мкл водного реагента метиламина при 60°C в течение 20 мин. Для последовательностей, содержащих 2'-рибозные остатки (2'-ОН), которые были защищены группой трет-бутилдиметилсилила (ТВДМС), вторую стадию снятия защиты выполняли с применением реагента TEA-3НФ (триэтиламина тригидрофторида). К раствору для снятия защиты с метиламином добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и 300 мкл реагента TEA-3НФ и раствор инкубировали в течение еще 20 мин при 60°C. В конце стадии отщепления и снятия защиты планшету для синтеза позволяли достичь комнатной температуры и проводили осаждение путем добавления 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 ч и супернатант осторожно декантировали при помощи многоканальной пипетки. Осадок с олигонуклеотидами ресуспендировали в 20 мМ буфера на основе NaOAc и обессоливали с помощью 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap (GE Healthcare) на системе для очистки АКТА, оснащенной автоматическим пробоотборником А905 и сборником фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали при помощи LC-MS для подтверждения идентичности, УФ (260 нм) для количественного определения, а выбранный набор образцов анализировали при помощи IEX-хроматографии для определения чистоты.

Гибридизацию отдельных нитей КНК выполняли на автоматическом устройстве Тесап для манипуляции с жидкостями. Эквимолярную смесь смысловых и антисмысловых отдельных нитей объединяли и гибридизовали в 96-луночных планшетах. После объединения комплементарных отдельных нитей 96-луночный планшет плотно запечатывали, и нагревали в печи при 100°C в течение 10 мин, и позволяли медленно достичь комнатной температуры в течение периода 2-3 ч. Концентрацию каждого дуплекса нормализовали к 10 мкМ в 1× PBS и затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

Культура клеток и трансфекции.

Клетки Нер3b трансфицировали путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Сорок мкл DMEM, содержащей  $\sim 5 \times 10^3$  клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ и эксперименты в отношении зависимости эффекта от дозы проводили в пределах диапазона конечной концентрации дуплекса от 10 нМ до 36 фМ с помощью 8, 6-кратных разведений.

Выделение общей РНК с применением набора для выделения mRNA на парамагнитных микрочастицах DYNABEADS.

РНК выделяли при помощи автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с применением парамагнитных микрочастиц DYNABEADS (Invitrogen, № по каталогу 61012). Вкратце, 50 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера и 25 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных гранул, добавляли к планшету с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы фиксировали и удаляли супернатант. Связанную с гранулой РНК затем промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и один раз промывочным буфером В. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно фиксировали и удаляли супернатант.

Синтез cDNA с применением высокопроизводительного набора для обратной транскрипции cDNA ABI (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по каталогу 4368813).

Десять мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию, добавляли к РНК, выделенной, как описано выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре с последующими 2 ч при 37°C. Планшеты затем инкубировали при 81°C в течение 8 мин.

ПЦР в режиме реального времени.

Два мкл cDNA добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Hs99999905), 0,5 мкл зонда для КНК (Hs00240827\_m1) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку, в 384-луночные планшеты (Roche, номер по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche) с применением  $\Delta\Delta C_t(RQ)$ -анализа. Каждый дуплекс исследовали при четырех независимых трансфекциях.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta Ct$  способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или модельно трансфицированными клетками. Значение  $IC_{50}$  рассчитывали с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с данными для клеток, трансфицированных AD-1955, или необработанных клеток.

Подробный перечень последовательностей смысловой и антисмысловой нитей для КНК приведен в табл. 6 и 7.

Результаты этих анализов с однократной дозой представлены в табл. 8. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с AD-1955.

В табл. 9 показана зависимость эффекта от дозы подмножества средств в клетках Нер3В, трансфицированных указанными iRNA. Указанные значения  $IC_{50}$  представляют значения  $IC_{50}$  в сравнении с необработанными клетками.

Таблица 6

## Немодифицированные последовательности КНК

Название дуплекса	Смысловая нить	SEQ ID NO:	Эталонная последовательность; соответствующее с целевой mRNA положение	Антисмысловая нить	SEQ ID NO:	Соответствующее целевой mRNA положение
AD-63824	AUCA AUGUGGUGGACAAA UAA	125	NM_008439.3_70-90_C21A_s	UUAAUUGUCCACCACAUUGAUGA	175	NM_008439.3_68-90_C21A_as
AD-63829	GGUGGACAAAUACCCAGAGGA	126	NM_008439.3_78-9880218_s	UCCUCUGGGUAUUUGUCCACCAC	176	NM_008439.3_76-9880218_as
AD-63855	CUUUGAGAAGGUCG AUCUGAA	127	NM_008439.3_39-3-413_C21A_s	UUCAGAUCCGACCUUCUCAAGUC	177	NM_008439.3_391-413_C21A_as
AD-63835	CCCGGUUCAAGUGGAUCCACA	128	NM_008439.3_41-3-4335-213_s	UGUGGAUCCACUUGAACCGGGUC	178	NM_008439.3_411-4335-213_as
AD-63845	UGUGGCCAAGCACCUGGGGUU	129	NM_008439.3_60-3-6235-213_s	AACCCAGGUGCUUGGCCACAUC	179	NM_008439.3_601-6235-213_as
AD-63823	UUGCAGGGGUUGAUGGCAUU	130	NM_008439.3_89-2-9124-212_s	AAUGCCAUCAAAACCCUGCAAGC	180	NM_008439.3_890-9124-212_as
AD-63863	GAAGAGAAGCAGAUCCUGUGA	131	XM_005264298.1_504-524_C21A_s	UCACAGGAUCUGCUUCUCUCCA	181	XM_005264298.1_502-524_C21A_as
AD-63881	AAGAGAAGCAGAUCCUGUGCA	132	XM_005264298.1_505-	UGCACAGGAUCUGCUUCUCUCC	182	XM_005264298.1_503-525_G21A_as

			525_G21A_s		
AD-63862	GAGAAGCAGAUCUGUGCGUA	133	XM_005264298.1 _507- 527_G21A_s	UACGCACAGGAUCUGCUUCUCUU	183 XM_005264298.1_5 05-527_G21A_as
AD-63887	AGAAGCAGAUCUGUGCGUGA	134	XM_005264298.1 _508- 528_G21A_s	UCACGCACAGGAUCUGCUUCUCUU	184 XM_005264298.1_5 06-528_G21A_as
AD-63902	GAAGCAGAUCUGUGCGUGGA	135	XM_005264298.1 _509- 529_G21A_s	UCCACGCACAGGAUCUGCUUCUC	185 XM_005264298.1_5 07-529_G21A_as
AD-63896	GCAGAUCUGUGCGUGGGGCU	136	XM_005264298.1 _512-532_s	AGCCCCACGCACAGGAUCUGCUU	186 XM_005264298.1_5 10-532_as
AD-63843	GAUCCUGUGCGUGGGGCUAGU	137	XM_005264298.1 _515-535_s	ACUAGCCCCACGCACAGGAUCUG	187 XM_005264298.1_5 13-535_as
AD-63857	GGUGGACAAGUACCCUAAGGA	138	XM_005264298.1 _557-577_s	UCCUUAGGGUACUUGUCCACCAG	188 XM_005264298.1_5 55-577_as
AD-63836	GCCUGCCAGAUGUGUCUGCUA	139	XM_005264298.1 _595-615_s	UAGCAGACACAUCUGGCAGGCUC	189 XM_005264298.1_5 93-615_as
AD-63834	UUUGAGAAGGUUGAUCUGACA	140	XM_005264298.1 _621- 641_C21A_s	UGUCAGAUAACCUUCUCAAGU	190 XM_005264298.1_6 19-641_C21A_as
AD-63839	GUUGAUCUGACCCAGUUCAAA	141	XM_005264298.1 _630- 650_G21A_s	UUUGAACUGGGUCAGAUAACCU	191 XM_005264298.1_6 28-650_G21A_as
AD-63821	AUCUGACCCAGUUCAGUGGA	142	XM_005264298.1 _634-654_s	UCCACUUGAACUGGGUCAGAUA	192 XM_005264298.1_6 32-654_as
AD-63847	CCAGUUAAGUGGAUCCACAU	143	XM_005264298.1 _641-661_s	AUGUGGAUCCACUUGAACUGGGU	193 XM_005264298.1_6 39-661_as
AD-63846	CAGUUAAGUGGAUCCACAUU	144	XM_005264298.1 _642-662_s	AAUGUGGAUCCACUUGAACUGGG	194 XM_005264298.1_6 40-662_as
AD-63826	AGUUAAGUGGAUCCACAUUA	145	XM_005264298.1 _643- 663_G21A_s	UAAUGUGGAUCCACUUGAACUGG	195 XM_005264298.1_6 41-663_G21A_as
AD-63841	GUUCAAGUGGAUCCACAUUGA	146	XM_005264298.1 _644-664_s	UCAAUGUGGAUCCACUUGAACUG	196 XM_005264298.1_6 42-664_as
AD-63856	UUCAAGUGGAUCCACAUUGAA	147	XM_005264298.1 _645- 665_G21A_s	UUCAAUGUGGAUCCACUUGAACU	197 XM_005264298.1_6 43-665_G21A_as
AD-63868	UCAAGUGGAUCCACAUUGAGA	148	XM_005264298.1 _646- 666_G21A_s	UCUCAAUGUGGAUCCACUUGAAC	198 XM_005264298.1_6 44-666_G21A_as
AD-63869	CAAGUGGAUCCACAUUGAGGA	149	XM_005264298.1 _647- 667_G21A_s	UCCUCAAUGUGGAUCCACUUGAA	199 XM_005264298.1_6 45-667_G21A_as
AD-63880	AAGUGGAUCCACAUUGAGGGA	150	XM_005264298.1 _648- 668_C21A_s	UCCUCAAUGUGGAUCCACUUGA	200 XM_005264298.1_6 46-668_C21A_as
AD-63875	AGUGGAUCCACAUUGAGGGCA	151	XM_005264298.1 _649- 669_C21A_s	UGCCUCAAUGUGGAUCCACUUG	201 XM_005264298.1_6 47-669_C21A_as

AD-63874	GUGGAUCCACAUUGAGGGCCA	152	XM_005264298.1 _650- 670_G21A_s	UGGCCCUCAAUGUGGAUCCACUU	202	XM_005264298.1_6 48-670_G21A_as
AD-63897	UGGAUCCACAUUGAGGGCCGA	153	XM_005264298.1 _651- 671_G21A_s	UCGGCCCUCAAUGUGGAUCCACU	203	XM_005264298.1_6 49-671_G21A_as
AD-63879	GAUCCACAUUGAGGGCCGGAA	154	XM_005264298.1 _653-673_s	UUCGGCCCUCAAUGUGGAUCCA	204	XM_005264298.1_6 51-673_as
AD-63819	GUGAAGAUUGCUGCAGCGGAUA	155	XM_005264298.1 _687-707_s	UAUCCGUGCAGCAUCUUCACCU	205	XM_005264298.1_6 85-707_as
AD-63825	GAAGAUGCUGCAGCGGAUAGA	156	XM_005264298.1 _689-709_s	UCUAUCCGUGCAGCAUCUUCAC	206	XM_005264298.1_6 87-709_as
AD-63837	UGGCUACGGAGACGUGGUGUU	157	XM_005264298.1 _797-817_s	AACACCACGUCUCCGUAGCCAAA	207	XM_005264298.1_7 95-817_as
AD-63853	GGCUACGGAGACGUGGUGUUU	158	XM_005264298.1 _798-818_s	AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA	208	XM_005264298.1_7 96-818_as
AD-63854	GCUACGGAGACGUGGUGUUUA	159	XM_005264298.1 _799- 819_G21A_s	UAAACACCACGUCUCCGUAGCCA	209	XM_005264298.1_7 97-819_G21A_as
AD-63859	GGAGACGUGGUGUUUGUCAGA	160	XM_005264298.1 _804- 824_C21A_s	UCUGACAAACACCACGUCUCCGU	210	XM_005264298.1_8 02-824_C21A_as
AD-63820	ACGUGGUGUUUGUCAGCAAU	161	XM_005264298.1 _808- 828_G21U_s	AUUUGCUGACAAACACCACGUCU	211	XM_005264298.1_8 06-828_G21U_as
AD-63851	GUGGUGUUUGUCAGCAAAGAU	162	XM_005264298.1 _810-830_s	AUCUUUGCUGACAAACACCACGU	212	XM_005264298.1_8 08-830_as
AD-63873	GGUGUUUGUCAGCAAAGAUGU	163	XM_005264298.1 _812-832_s	ACAUCUUUGCUGACAAACACCAC	213	XM_005264298.1_8 10-832_as
AD-63886	GUGUUUGUCAGCAAAGAUGUA	164	XM_005264298.1 _813- 833_G21A_s	UACAUCUUUGCUGACAAACACCA	214	XM_005264298.1_8 11-833_G21A_as
AD-63892	UGUUUGUCAGCAAAGAUGUGA	165	XM_005264298.1 _814- 834_G21A_s	UCACAUCUUUGCUGACAAACACC	215	XM_005264298.1_8 12-834_G21A_as
AD-63901	GUUUGUCAGCAAAGAUGUGGA	166	XM_005264298.1 _815- 835_C21A_s	UCCACAUCUUUGCUGACAAACAC	216	XM_005264298.1_8 13-835_C21A_as
AD-63885	UUGUCAGCAAAGAUGUGGCCA	167	XM_005264298.1 _817-837_s	UGGCCACAUCUUUGCUGACAAAC	217	XM_005264298.1_8 15-837_as
AD-63861	UGUCAGCAAAGAUGUGGCCAA	168	XM_005264298.1 _818-838_s	UUGGCCACAUCUUUGCUGACAAA	218	XM_005264298.1_8 16-838_as
AD-63842	UGUGGCCAAGCACUUGGGGUU	169	XM_005264298.1 _830-850_s	AACCCCAAGUGCUUGGCCACAUC	219	XM_005264298.1_8 28-850_as
AD-63849	AGCACUUGGGGUUCCAGUCA	170	XM_005264298.1 _838- 858_G21A_s	UUGACUGGAACCCCAAGUGCUUG	220	XM_005264298.1_8 36-858_G21A_as
AD-63844	GGGCUUGUAUGGUCGUGUGAA	171	XM_005264298.1 _875- 895_G21A_s	UUCACACGACCAUACAAGCCCU	221	XM_005264298.1_8 73-895_G21A_as

AD-63832	UUGUAUGGUCGUGAGGAAA	172	XM_005264298.1 _879-899_s	UUUCCUCACACGACCAUACAAGC	222	XM_005264298.1_8 77-899_as
AD-63827	GGUCGUGAGGAAAGGGGCU	173	XM_005264298.1 _885-905_s	AGCCCUUCCUCACACGACCAU	223	XM_005264298.1_8 83-905_as
AD-63858	GAGGAAAGGGGUCUGCUUGU	174	XM_005264298.1 _893-913_s	ACAAGCACAGCCCUUCCUCAC	224	XM_005264298.1_8 91-913_as

Таблица 7

## Модифицированные последовательности КНК

Название дуплекса	Название смыслового олигомера	Смысловая нить	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигомера	Антисмысловая нить	SEQ ID NO:	Вид
AD-63824	A-127677	AfsusCfaAfuGfuGfGfUfgGfaCfaAfaUfaAfl96	225	A-127678	usUfsaUfuUfgUfcCfaceAfcAfuUfgAfusgsa	275	Mm
AD-63829	A-127663	GfsgsUfgGfaCfaAfaUfaCfcCfaGfaGfaAfl96	226	A-127664	usCfscUfcUfgGfgUfaauUfgUfcCfaCfesasc	276	Mm
AD-63855	A-127673	CfsusUfuGfaGfaAfGfGfuCfGfAfuCfuGfaAfl96	227	A-127674	usUfscAfgAfuCfGfAfcuUfcUfcAfaAfgsusc	277	Mm
AD-63835	A-127665	CfscsCfGfUfuUfcAfaGfGfuGfGfAfuCfcAfcAfl96	228	A-127666	usGfsuGfgAfuCfcAfcuuGfaAfcCfGfGfGfsusc	278	Mm
AD-63845	A-127669	UfsgsUfgGfcCfaAfGfCfaCfcUfgGfgGfuUfl96	229	A-127670	asAfsccCfcCfaGfgUfgcuUfgGfcCfaCfasusc	279	Mm
AD-63823	A-127661	UfsusGfcAfgGfgGfUfuUfuGfaUfgGfcAfuUfl96	230	A-127662	asAfsuGfcCfaUfcAfaacCfcCfuGfcAfasgsc	280	Mm
AD-63863	A-127587	GfsasAfgAfgAfaGfCfaGfAfuCfcUfgUfgAfl96	231	A-127588	usCfsaCfaGfgAfuCfugeUfuCfuUfcUfcscsa	281	Hs
AD-63881	A-127593	AfsasGfaGfaAfgCfaAfgAfuUfcCfuGfuGfaAfl96	232	A-127594	usGfscAfcAfgGfaUfcuugCfuUfcUfcUfcscsc	282	Hs
AD-63862	A-127571	GfsasGfaGfaCfaGfAfuUfcCfuGfuGfaAfl96	233	A-127572	usAfsccGfcAfcAfgGfaucUfgCfuUfcUfcscsu	283	Hs
AD-63887	A-127595	AfsgsAfaGfcAfgAfuUfcUfgUfgCfuUfgAfl96	234	A-127596	usCfsaCfGcCfaCfaGfgauUfgGfcAfgGfscscsu	284	Hs
AD-63902	A-127585	GfsasAfgCfaGfaUfCfCfuGfuGfcUfgGfaAfl96	235	A-127586	usCfscAfcGfcAfcAfgauUfcUfgCfuUfcscsc	285	Hs
AD-63896	A-127567	GfscsAfgAfuCfcUfgUfgCfGfUfgGfgGfuUfl96	236	A-127568	asGfscCfcCfaCfGcfacaGfgAfuCfuGfscscsu	286	Hs
AD-63843	A-127637	GfsasUfcCfuGfuGfCfGfuGfgGfCfuAfgUfl96	237	A-127638	asCfsuAfgCfcCfcAfcgcAfcAfgGfaUfcscscsu	287	Hs
AD-63857	A-127627	GfsgsUfgGfaCfaAfgUfuUfcCfuAfaGfaAfl96	238	A-127628	usCfscUfuAfgGfgUfacuUfgUfcCfaCfcscscsu	288	Hs
AD-63836	A-127603	GfscsCfuGfcCfaGfAfuUfgUfcUfgCfuUfgAfl96	239	A-127604	usAfsGcCfaGfaCfaCfaUfgUfgGfcAfgGfscscsu	289	Hs
AD-63834	A-127649	UfsusUfgAfgAfaGfGfUfuUfuUfgAfcAfl96	240	A-127650	usGfsuCfaGfaUfcAfaaccUfuCfuCfaAfasgsc	290	Hs
AD-63839	A-127651	GfsusUfgAfuCfuGfAfcCfcCfaGfuUfcAfaAfl96	241	A-127652	usUfsuGfaAfcUfgGfgucAfgAfuCfaAfcscscsu	291	Hs
AD-63821	A-127629	AfsusCfuGfaCfcCfaAfgUfuUfcAfaGfuGfaAfl96	242	A-127630	usCfscAfcUfuGfaAfcuugGfgUfcAfgAfcscscsa	292	Hs
AD-63847	A-127623	CfscsAfgUfuCfaAfgUfuUfgGfaUfcCfaCfaAfl96	243	A-127624	asUfsgUfgGfaUfcCfaucUfgAfuCfuGfsgscsu	293	Hs
AD-63846	A-127607	CfsasAfgUfcAfaGfuUfgGfaUfcAfcAfuUfl96	244	A-127608	asAfsuGfuGfgAfuCfaucUfuGfaAfaCfsgscsu	294	Hs
AD-63826	A-127615	AfsgsUfuCfaAfgUfgGfGfaUfcCfaCfaUfl96	245	A-127616	usAfsaUfgUfgGfaUfcacaCfuUfgAfaCfsgscsu	295	Hs
AD-63841	A-127605	GfsusUfcAfaGfuGfGfAfuCfcAfcAfuUfgAfl96	246	A-127606	usCfsaAfuGfuGfgAfuaccAfcUfuGfaAfcscscsu	296	Hs
AD-63856	A-127611	UfsusCfaAfgUfgGfaUfcCfaCfaUfuGfaAfl96	247	A-127612	usUfscAfaUfgUfgGfaucCfaCfuUfgAfcscscsu	297	Hs
AD-63868	A-127573	UfscsAfaGfuGfgAfuUfcCfcAfcAfuUfgAfl96	248	A-127574	usCfsuCfaAfuGfuGfgauCfcAfcUfuGfascscsu	298	Hs
AD-63869	A-127589	CfsasAfgUfgGfaGfAfuUfgGfaGfaAfl96	249	A-127590	usCfscUfcAfaUfgUfgGfaUfcCfaCfuUfsgscsu	299	Hs
AD-63880	A-127577	AfsasGfuGfgAfuCfCfAfcAfuUfgAfgGfaAfl96	250	A-127578	usCfscCfuCfaAfuGfugGfuCfcAfcUfusgsa	300	Hs
AD-63875	A-127591	AfsgsUfgGfaUfcCfaAfcCfaUfuGfaGfgCfaAfl96	251	A-127592	usGfscCfcUfcAfaUfgugGfaUfcCfaCfususc	301	Hs
AD-63874	A-127575	GfsusGfaAfuCfcAfcAfuUfgAfgGfgCfcAfl96	252	A-127576	usGfsgCfcCfuCfaAfuugGfgAfuCfcAfcscscsu	302	Hs
AD-63897	A-127583	UfsgsGfaUfcCfaCfaUfuGfaGfgCfcCfaAfl96	253	A-127584	usCfsgGfcCfcUfcAfaugUfgGfaUfcCfascscsu	303	Hs
AD-63879	A-127561	GfsasUfcCfaCfaUfuUfgGfaGfgGfcCfuUfl96	254	A-127562	usUfscCfGcCfcCfuUfcuugCfaCfuUfgGfscscsa	304	Hs
AD-63819	A-127597	GfsusGfaAfgAfuGfCfUfgCfaGfcGfgAfuAfl96	255	A-127598	usAfsuCfcGfcUfgCfageAfuCfuUfcAfcscscsu	305	Hs
AD-63825	A-127599	GfsasAfgAfuGfuUfgGfCfaGfcGfgAfuAfl96	256	A-127600	usCfsuAfuCfcGfcUfgcaGfcAfuCfuUfcscscsu	306	Hs
AD-63837	A-127619	UfsgsGfcUfcCfaCfGfAfgCfaCfuGfuUfl96	257	A-127620	asAfsccAfcCfaCfGfUfcuugCfuGfaCfascscsa	307	Hs
AD-63853	A-127641	GfsgsCfuAfcGfgAfgAfcGfuGfgUfuUfl96	258	A-127642	asAfsaCfaCfcAfcGfucCfcGfuAfgCfscscsa	308	Hs
AD-63854	A-127657	GfscsUfcCfGfGfaGfAfcUfgGfuUfuUfl96	259	A-127658	usAfsaAfcAfcCfaCfGucUfcCfuUfgGfscscsa	309	Hs
AD-63859	A-127659	GfsgsAfgAfcGfuGfGfUfgUfuUfgUfcAfgAfl96	260	A-127660	usCfsuGfaCfaAfaCfaceAfcGfuCfuCfscscsu	310	Hs
AD-63820	A-127613	AfscsGfuGfgUfgUfuUfgUfcAfgCfaAfuUfl96	261	A-127614	asUfsuUfgCfuGfaCfaaaCfaCfcAfcGfscscsu	311	Hs
AD-63851	A-127609	GfsusGfgUfgUfuUfgGfUfcAfgCfaAfaGfaUfl96	262	A-127610	asUfscUfuUfgCfuGfacaAfaCfaCfcscscsu	312	Hs
AD-63873	A-127559	GfsgsUfgUfuUfgUfCfAfgCfaAfaGfaUfl96	263	A-127560	asCfsaUfcUfuUfgCfugaCfaAfaCfaCfscscsu	313	Hs
AD-63886	A-127579	GfsusGfuUfuGfuCfAfgCfaAfaGfaUfl96	264	A-127580	usAfsccAfuCfuUfgCfugAfcAfaAfcAfcscscsa	314	Hs
AD-63892	A-127581	UfsgsUfuUfgUfcAfgCfcaAfaGfaUfgUfl96	265	A-127582	usCfsaCfaUfcUfuUfgcuGfaCfaAfaCfascscsu	315	Hs
AD-63901	A-127569	GfsusUfuGfuCfaGfCfaAfaGfaUfgGfaAfl96	266	A-127570	usCfscAfcAfuCfuUfgucUfgAfcAfaAfcscscsu	316	Hs
AD-63885	A-127563	UfsusGfuCfaGfcAfaAfgAfuGfuGfcCfaAfl96	267	A-127564	usGfsgCfcAfcAfuCfuuuGfcUfgAfcAfcscscsu	317	Hs
AD-63861	A-127555	UfsgsUfcAfgCfaAfaGfAfuUfgGfcCfaAfl96	268	A-127556	usUfsgGfcCfaCfaUfcuuUfgCfuGfaCfascscsu	318	Hs
AD-63842	A-127621	UfsgsUfgGfcCfaAfgCfcaCfuUfgGfgUfl96	269	A-127622	asAfsccCfcCfaAfgUfgcuUfgGfcCfaCfascscsu	319	Hs
AD-63849	A-127655	AfsgsCfaCfuUfgGfGfgUfcCfaGfuCfaAfl96	270	A-127656	usUfsgAfcUfgGfaAfcaccCfaAfgUfgCfususc	320	Hs
AD-63844	A-127653	GfsgsGfcUfuGfuAfuUfgUfcGfuGfuGfaAfl96	271	A-127654	usUfscAfcAfcGfaCfaucAfcAfaGfcCfscscsu	321	Hs
AD-63832	A-127617	UfsusGfuAfuGfuUfCfGfuGfuGfgAfaAfl96	272	A-127618	usUfsuCfcUfcAfcAfcgaCfcAfuAfcAfasgsc	322	Hs
AD-63827	A-127631	GfsgsUfcGfuGfuAfgGfgAfaAfgGfcGfuUfl96	273	A-127632	asGfscCfcCfuUfuCfcueAfcAfcGfaCfscscsu	323	Hs
AD-63858	A-127643	GfsasGfgAfaAfgGfGfcUfgUfgCfuUfl96	274	A-127644	asCfsaAfgCfaCfaGfccCfuUfuCfuUfcscscsu	324	Hs

Таблица 8

Анализы с однократной дозой в НерЗб в отношении КНК

ID дуплекса	10 нМ_AVG	0,1 нМ_AVG	10 нМ_STDEV	0,1 нМ_STDEV
AD-63819	82,0	82,1	24,1	10,0
AD-63820	11,2	45,6	нет данных	3,6
AD-63821	68,2	102,4	19,8	10,5
AD-63823	134,3	84,4	22,3	14,0
AD-63824	94,1	98,0	4,1	4,3
AD-63825	70,4	77,7	6,5	5,3
AD-63826	45,3	89,7	5,5	7,5
AD-63827	51,7	130,0	21,2	82,8
AD-63829	89,6	78,2	1,3	1,5
AD-63832	17,4	80,5	1,4	19,5
AD-63834	11,0	72,7	0,8	20,7
AD-63835	17,2	103,5	8,1	76,4
AD-63836	37,7	63,8	2,8	23,5
AD-63837	87,3	66,8	33,0	5,2
AD-63839	нет данных	34,0	нет данных	2,8
AD-63841	46,4	64,4	0,7	7,9
AD-63842	72,6	76,9	22,7	13,9
AD-63843	48,6	108,0	9,0	35,8
AD-63844	68,2	80,1	16,5	12,9
AD-63845	54,4	68,1	43,3	4,0
AD-63846	66,0	88,9	18,8	2,2
AD-63847	43,7	58,1	17,5	12,7
AD-63849	31,0	85,4	4,4	30,3
AD-63851	28,9	29,5	4,1	21,4
AD-63853	39,9	49,3	0,0	11,7
AD-63854	7,1	53,3	2,6	10,1
AD-63855	15,0	32,6	14,5	7,3
AD-63856	66,8	96,9	3,3	15,1
AD-63857	64,9	101,4	7,3	3,5
AD-63858	67,5	89,9	5,6	18,8
AD-63859	44,8	91,0	1,1	10,2
AD-63861	78,2	89,1	0,0	8,3
AD-63862	48,0	92,9	14,8	14,5
AD-63863	39,3	65,7	17,9	13,1
AD-63868	47,4	106,8	4,4	13,1
AD-63869	20,7	68,0	3,8	28,2
AD-63873	22,6	102,8	8,0	31,7
AD-63874	64,7	107,6	2,9	6,3
AD-63875	85,2	108,4	30,6	60,3
AD-63879	66,1	81,1	3,6	7,9
AD-63880	86,7	85,9	19,4	3,8
AD-63881	60,8	63,1	4,5	3,1
AD-63885	75,1	66,3	12,4	11,6
AD-63886	27,5	53,3	5,1	7,8

AD-63887	40,0	70,5	8,4	0,7
AD-63892	19,9	82,7	1,5	5,7
AD-63896	88,6	86,6	1,7	15,6
AD-63897	96,7	91,4	4,3	4,9
AD-63901	48,1	97,6	4,5	2,9
AD-63902	43,1	99,2	8,6	9,7

Таблица 9

Анализ зависимости эффекта от дозы в Her3b в отношении КНК

ID дуплекса	IC50 (нМ)
AD-63851	0,027
AD-63820	0,010
AD-63853	0,067
AD-63839	0,015
AD-63854	0,075
AD-63855	0,017853
AD-63886	0,082879

Эквиваленты.

Специалисты в данной области распознают или смогут определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухнитевой RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК), где указанное средство на основе двухнитевой RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от последовательности нуклеотидов 798-833 SEQ ID NO: 5, и указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от последовательности нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6,

смысловая нить и антисмысловая нить, каждая независимо, имеют длину 17-25 нуклеотидов, не более 5 нуклеотидов смысловой цепи и не более 5 нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды и

указанная смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

2. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1, где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат нуклеотидную модификацию.

3. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.2, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации нуклеотида, модификации нуклеотида, содержащего модификацию 5'-фосфоротиоатной группы, модификации дезоксинуклеотида, модификации 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модификации нуклеотида, 2'-фтор-модификации нуклеотида, модификации 2'-дезоксинуклеотида, модификации концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, модификации 2'-дезоксидеокси-2'-фторнуклеотида, модификации "запертого" нуклеотида, модификации "незапертого" нуклеотида, модификации конформационно ограниченного нуклеотида, модификации затрудненного этилом нуклеотида, модификации нуклеотида, лишённого азотистого основания, модификации 2'-аминонуклеотида, модификации 2'-О-аллилнуклеотида, модификации 2'-С-алкилнуклеотида, модификации 2'-гидроксинуклеотида, модификации 2'-метоксиэтилнуклеотида, модификации 2'-О-алкилнуклеотида, модификации морфолинового нуклеотида, модификации фосфорамидата, модификации нуклеотида, содержащего не встречающиеся в природе основания, модификации тетрагидропиранового нуклеотида, модификации 1,5-ангидрогекситолнуклеотида, модификации циклогексенилнуклеотида, модификации нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, модификации нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, модификации нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и модификации нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфат.

4. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.2, где модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил-модификации или 2'-фтор-модификации.

5. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступ

по меньшей мере из 1 нуклеотида или 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

6. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1, где указанное средство на основе двухнитевой RNAi дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

7. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.6, где указанное средство на основе двухнитевой RNAi содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

8. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.7, где антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

9. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

10. Средство на основе двухнитевой RNAi для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КHK), где указанное средство на основе двухнитевой RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевую участок,

указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от последовательности нуклеотидов 798-833 SEQ ID NO: 5, а указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от последовательности нуклеотидов соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6,

смысловая нить и антисмысловая нить, каждая независимо, имеют длину 17-25 нуклеотидов,

не более 5 нуклеотидов указанной смысловой цепи содержат модификацию, отличную от модификации нуклеотидов, выбранной из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

указанная смысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

не более 5 нуклеотидов указанной антисмысловой цепи содержат модификацию, отличную от модификации нуклеотидов, выбранной из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

указанная антисмысловая нить содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце и

указанная смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный двухвалентный или трехвалентный линкер на 3'-конце.

11. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.10, где все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи содержат модификацию нуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации.

12. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов.

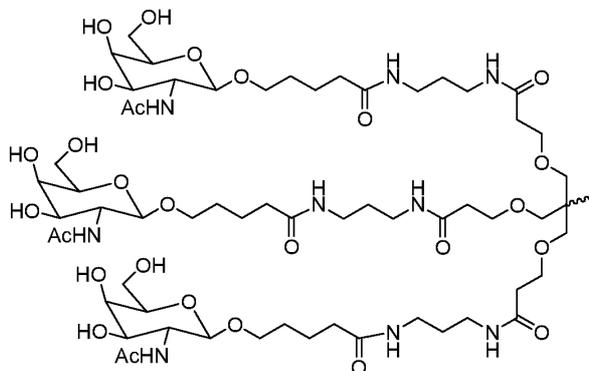
13. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

14. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где каждая нить независимо имеет длину 19-25 нуклеотидов.

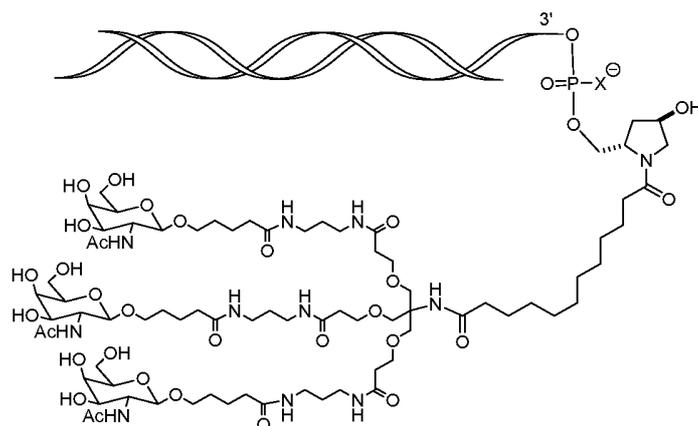
15. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где длина каждой цепи независимо составляет 17-23 нуклеотида.

16. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где длина каждой цепи независимо составляет 19-23 нуклеотида.

17. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где лиганд представляет собой



18. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.17, где средство на основе двухнитевой RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

19. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.1 или 10, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- 5'-AUCUUUGCUGACAAACACCACGU-3' (SEQ ID NO: 212),  
 5'-AUUUGCUGACAAACACCACGUCU-3' (SEQ ID NO: 211),  
 5'-AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA-3' (SEQ ID NO: 208),  
 5'-UAAACACCACGUCUCCGUAGCCA-3' (SEQ ID NO: 209),  
 5'-UACAUCUUUGCUGACAAACACCA-3' (SEQ ID NO: 214),  
 5' - ACAUCUUUGCUGACAAACACCAC-3' (SEQ ID NO: 213).

20. Средство на основе двухнитевой RNAi по п.19, где:

(a) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-GUGGUGUUUGUCAGCAAAGAU-3' (SEQ ID NO: 162) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-AUCUUUGCUGACAAACACCACGU-3' (SEQ ID NO: 212); или

(b) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-ACGUGGUGUUUGUCAGCAAUU-3' (SEQ ID NO: 161) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-AUUUGCUGACAAACACCACGUCU-3' (SEQ ID NO: 211); или

(c) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-GGCUACGGAGACGUGGUGUUU-3' (SEQ ID NO: 158) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-AAACACCACGUCUCCGUAGCCAA-3' (SEQ ID NO: 208); или

(d) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-GCUACGGAGACGUGGUGUUUA-3' (SEQ ID NO: 159) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-UAAACACCACGUCUCCGUAGCCA-3' (SEQ ID NO: 209); или

(e) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-GUGUUUGUCAGCAAAGAUGUA-3' (SEQ ID NO: 164) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-UACAUCUUUGCUGACAAACACCA-3' (SEQ ID NO: 214); или

(f) смысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-GGUGUUUGUCAGCAAAGAUGU-3' (SEQ ID NO: 163) и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 5'-ACAUCUUUGCUGACAAACACCAC-3' (SEQ ID NO: 213).

21. Выделенная клетка, содержащая средство на основе двухнитевой RNAi по любому из пп.1-20.

22. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КHK), содержащая средство на основе двухнитевой RNAi по любому из пп.1-20.

23. Фармацевтическая композиция по п.22, где средство на основе двухнитевой RNAi находится в незабуференном растворе.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, где незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

25. Фармацевтическая композиция по п.22, где средство на основе двухнитевой RNAi находится в буферном растворе.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

27. Фармацевтическая композиция по п.25, где буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

28. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КHK), содержащая средство на основе двухнитевой RNAi по любому из пп.1-20 и липидный состав.

29. Способ *in vitro* ингибирования экспрессии кетогексокиназы (КНК) в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт со средством на основе двухнитевой RNAi по любому из пп.1-20 или фармацевтической композицией по любому из пп.22-28 и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта mRNA гена КНК с ингибированием тем самым экспрессии гена КНК в клетке.

30. Способ лечения субъекта с нарушением, ассоциированным с кетогексокиназой (КНК), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе двухнитевой RNAi по любому из пп.1-20 или фармацевтической композиции по любому из пп.22-28, таким образом лечение указанного субъекта.

31. Способ по п.30, где субъектом является человек.

32. Способ по п.30, где заболевание, ассоциированное с кетогексокиназой, выбрано из группы, состоящей из заболевания печени, дислипидемии, нарушений гликемического контроля, сердечно-сосудистого заболевания, заболевания почек, метаболического синдрома, дисфункции адипоцитов, отложения висцерального жира, ожирения, гиперурикемии, подагры, расстройств пищевого поведения и чрезмерного пристрастия к сахару.

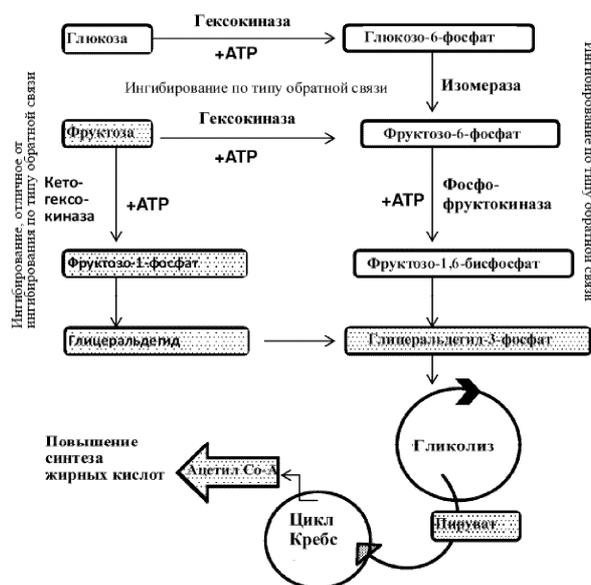
33. Способ по п.32, где заболевание печени представляет собой жировое перерождение печени и/или стеатогепатит.

34. Способ по п.32, где дислипидемия выбрана из группы, состоящей из гиперлипидемии, высокого уровня холестерина LDL, низкого уровня холестерина HDL, гипертриглицеридемии и постпрандиальной гипертриглицеридемии.

35. Способ по п.32, где нарушение гликемического контроля представляет собой инсулинорезистентность и/или диабет.

36. Способ по п.32, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой гипертензию и/или дисфункцию эндотелиальных клеток.

37. Способ по п.32, где заболевание почек выбрано из группы, состоящей из острого нарушения функции почек, канальцевой дисфункции и провоспалительных изменений проксимальных канальцев.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2