

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390261** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.31

(22) Дата подачи заявки
2015.08.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) СРЕДСТВА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ СОБОЙ МОДИФИЦИРОВАННУЮ ДВУХНИТЕВУЮ РНК

(31) **62/039,507; 62/083,744; 62/093,919**

(32) **2014.08.20; 2014.11.24; 2014.12.18**

(33) **US**

(62) **201790420; 2015.08.14**

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

(72) Изобретатель:
**Майер Мартин, Фостер Дон,
Милстейн Стюарт, Кучиманчи
Сатия, Джадхав Васант, Раджив
Каллантхоттатхил, Манохаран
Мутхиах, Пармар Рубина (US)**

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

(57) Один аспект настоящего изобретения относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), способному подавлять экспрессию целевого гена. Смысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один указанный нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку (положения 2-8) антисмысловой нити; а антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит по меньшей мере два нуклеотида с модификацией, придающей нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему, где указанные нуклеотиды с модификацией разделены участком длиной 11 нуклеотидов. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим эти средства, представляющие собой dsRNA, подходящие для применения в терапевтических целях, и к способам подавления экспрессии целевого гена путем введения этих средств, представляющих собой dsRNA, например, для лечения различных патологических состояний.

A1

202390261

202390261

A1

**СРЕДСТВА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИЕ СОБОЙ МОДИФИЦИРОВАННУЮ ДВУХНИТЕВУЮ
РНК**

Данная заявка заявляет преимущества приоритета предварительной заявки на патент США № 62/093919, поданной 18 декабря 2014 г.; предварительной заявки на патент США № 62/083744, поданной 24 ноября 2014 г.; а также предварительной заявки на патент США № 62/039507, поданной 20 августа 2014 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к средствам, представляющим собой дуплекс для RNAi, с определенными мотивами, которые являются предпочтительными для подавления экспрессии целевого гена, а также к композициям для RNAi, подходящим для применения в терапевтических целях. Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы подавления экспрессии целевого гена путем введения этих средств, представляющих собой дуплекс для RNAi, например, для лечения различных заболеваний.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

РНК-интерференция или "RNAi" представляет собой термин, который изначально ввел в обращение Fire с сотрудниками для описания наблюдения, что двухнитевая РНК (dsRNA) для RNAi может блокировать экспрессию гена (Fire *et al.* (1998) *Nature* **391**, 806-811; Elbashir *et al.* (2001) *Genes Dev.* **15**, 188-200). Короткая dsRNA управляет ген-специфичным посттранскрипционным сайленсингом у многих организмов, в том числе у позвоночных, и обеспечила новый инструмент для изучения функции генов. RNAi опосредуется РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC), специфичной к последовательности, многокомпонентной нуклеазой, которая разрушает матричные РНК, гомологичные инициатору сайленсинга. Известно, что RISC содержит короткие РНК (длиной примерно 22 нуклеотида), происходящие из двухнитевой РНК-инициатора, однако белковые компоненты этого активного комплекса остаются неизвестными.

Молекулы двухнитевых РНК (dsRNA) с надлежащими свойствами сайленсинга генов необходимы для разработки лекарственных средств, в основе которых лежит РНК-интерференция (RNAi). Начальной стадией RNAi является активация РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC), для чего необходимо разрушение смысловой нити из dsRNA-дуплекса. Считалось, что смысловая нить выступает в качестве первого субстрата для RISC, который расщепляется белком Argonaute 2 посередине дуплексного участка. Непосредственно после того, как расщепленные 5'-концевой и 3'-концевой фрагменты смысловой нити удаляются от эндонуклеазы Ago2, RISC становится активированным при помощи антисмысловой нити (Rand et al. (2005) *Cell* 123, 621).

Полагали, что при подавлении расщепления смысловой нити эндонуклеотическое расщепление целевой мРНК нарушается (Leuschner et al. (2006) *EMBO Rep.*, 7, 314; Rand et al. (2005) *Cell* 123, 621; Schwarz et al. (2004) *Curr. Biol.* 14, 787). Leuschner et al. показали, что встраивание 2'-O-Me-рибозы в сайт расщепления для Ago2 в смысловой нити подавляет RNAi в клетках HeLa (Leuschner et al. (2006) *EMBO Rep.*, 7, 314). Подобный эффект наблюдали в случае фосфоротиоатных модификаций, что указывает на то, что расщепление смысловой нити необходимо для эффективной RNAi также и у млекопитающих.

Morrissey et al. применяли siRNA-дуплекс, содержащий 2'-F-модифицированные остатки, среди прочих сайтов и модификаций, также в сайте расщепления для Ago2, и наблюдали активность сайленсинга, сравнимую с таковой у немодифицированных siRNA (Morrissey et al. (2005) *Hepatology* 41, 1349). Однако модификация, выполненная Morrissey, не является мотив-специфичной, например, одна модификация включает 2'-F-модификации на всех пиримидиновых основаниях как в смысловой, так и в антисмысловой нитях, при условии присутствия пиримидинового остатка без какой-либо селективности; следовательно, исходя из этих данных остается неясным, может ли модификация специфичного мотива в сайте расщепления смысловой нити оказывать какой-либо фактический эффект на активность сайленсинга генов.

Muhonen et al. применяли siRNA-дуплекс, содержащий два 2'-F-модифицированных остатка в сайте расщепления для Ago2 на смысловой или антисмысловой нити, и обнаружили, что это было допустимо (Muhonen et al. (2007) *Chemistry & Biodiversity* 4, 858-873). Однако модификация, выполненная Muhonen, также является специфичной в отношении последовательности, например, в каждой конкретной нити Muhonen модифицировал только либо все пиримидиновые основания, либо все пуриновые основания без какой-либо селективности.

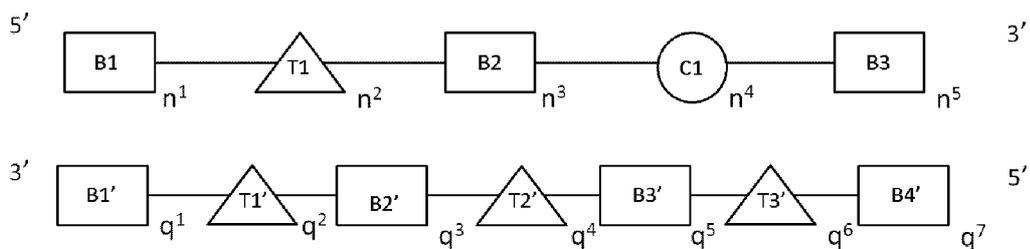
Choung et al. применяли siRNA-дуплекс, имеющий перемежающиеся модификации с помощью 2'-OMe или различные комбинации 2'-F, 2'-OMe и фосфоротиоатных модификаций для стабилизации siRNA Sur10058 в сыворотке крови (Choung et al. (2006) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342, 919-927). Choung высказал предположение, что остатки в сайте расщепления антисмысловой нити не следует модифицировать с помощью 2'-OMe, чтобы повысить стабильность siRNA.

Таким образом, существует постоянная потребность в средствах, представляющих собой дуплекс для РНК-интерференции, чтобы увеличить эффективность сайленсинга генов у средств для генной терапии на основе siRNA. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение данной потребности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены эффективные нуклеотидные или химические мотивы для средств, представляющих собой dsRNA, необязательно конъюгированных по меньшей мере с одним лигандом, которые являются предпочтительными для подавления экспрессии целевого гена, а также композиции для RNAi, подходящие для применения в терапевтических целях.

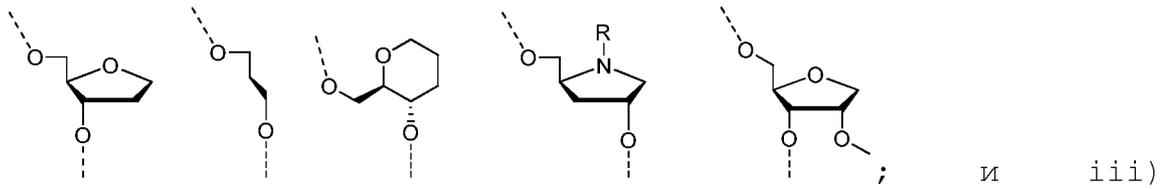
Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Средство, представляющее собой dsRNA, представлено формулой (I):



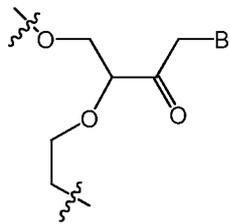
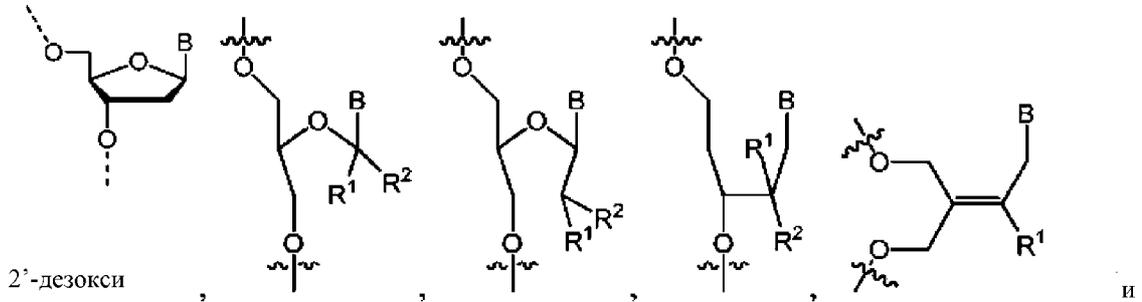
(I).

В формуле (I) каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. Согласно одному варианту осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' имеет 2'-OMe-модификации. Согласно одному варианту осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' имеет 2'-OMe- или 2'-F-модификации. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' имеет 2'-O-N-метилацетидамо (2'-O-NMA)-модификацию.

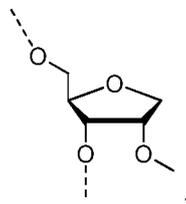
C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид, помещенный в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити (т. е. находящемуся в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). Например, C1 находится в положении на смысловой нити, которое образует пару с нуклеотидом в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой нити. C1 нуклеотид несет нарушающую термостабильность модификацию, которая может включать модификацию с удалением азотистого основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом в дуплексе и модификацию сахара, такую как 2'-дезокси-модификация или ациклический нуклеотид, например, незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA). Согласно одному варианту осуществления C1 имеет нарушающую термостабильность модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в антисмысловой нити; ii) модификации с удалением азотистого основания, выбранной из группы, состоящей из:



модификации сахара, выбранной из группы, состоящей из:



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Согласно одному варианту осуществления нарушающая термостабильность модификация в C1 представляет собой ошибочное спаривание, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и необязательно по меньшей мере одно нуклеиновое основание в ошибочно спаренной паре представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание. Согласно одному примеру нарушающая термостабильность модификация



в C1 представляет собой GNA или

Каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Стерический объем означает сумму стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов

модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может находиться в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида, или модификация может находиться в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или в остове нуклеотида в положении, которое является аналогичным или подобным 2'-положению в рибозном сахаре, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Например, каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. Согласно одному варианту осуществления T1 представляет собой ДНК. Согласно одному варианту осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. Согласно одному варианту осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. Согласно одному варианту осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

Длина n^1 , n^3 и q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов.

Длина n^5 , q^3 и q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов.

Длина n^4 , q^2 и q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0.

Длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

Длина n^2 и q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотидов.

В качестве альтернативы длина n^4 составляет 0-3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления n^4 может равняться 0. Согласно одному примеру n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1. Согласно другому примеру n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1, при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления каждый из n^4 , q^2 и q^6 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления, каждый из n^2 , n^4 , q^2 , q^4 и q^6 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления C1 находится в

положениях 14-17 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида и n^4 равняется 1. Согласно одному варианту осуществления С1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой нити

Согласно одному варианту осуществления Т3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити Согласно одному примеру Т3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити и q^6 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления Т1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру Т1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити и q^2 равняется 1.

Согласно иллюстративному варианту осуществления Т3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой нити, а Т1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру Т3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой нити и q^6 равняется 1, а Т1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой нити и q^2 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления Т1' и Т3' разделены участком длиной 11 нуклеотидов (т. е. без учета нуклеотидов Т1' и Т3').

Согласно одному варианту осуществления Т1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру Т1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити и q^2 равняется 1, а модификация находится в 2'-положении или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией.

Согласно одному варианту осуществления Т3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру Т3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити и q^6 равняется 1, а модификация в 2'-положении или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида придает меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией или равный ей.

Согласно одному варианту осуществления Т1 находится в сайте

расщепления смысловой нити. Согласно одному примеру T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида и n^2 равняется 1. Согласно иллюстративному варианту осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида и n^2 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления T2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити и q^4 равняется 1.

Согласно иллюстративному варианту осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити, к примеру, в положении 11 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой нити и q^2 равняется 1, при этом модификация в T1' находится в 2'-положении рибозного сахара или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-OMe-модификацией; T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити и q^4 равняется 1; а T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой нити и q^6 равняется 1, при этом модификация T3' находится в 2'-положении или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-OMe-модификацией. или равняется ему.

Согласно одному варианту осуществления T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой нити и q^4 равняется 2.

Согласно одному варианту осуществления T2' начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно одному примеру T2' находится в положении 9 от 5'-конца антисмысловой нити и q^4 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления B1' представляет

собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления n^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1' представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2' представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 6, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 6, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две

фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 5, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 5, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотриоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотриоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотриоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1.

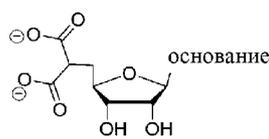
Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотриоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5

смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

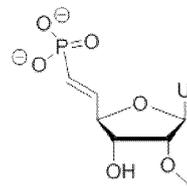
Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

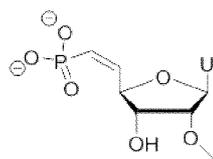
Средство, представляющее собой dsRNA, может иметь фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити или антисмысловой нити. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат



(MePhos) или 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил (). Если 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), то 5'-VP может представлять собой либо



изомер 5'-E-VP (т. е. *транс*-винилфосфат,



5'-Z-VP (т. е. *цис*-винилфосфат,

либо их смеси. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, имеет фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, имеет фосфорсодержащую группу на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-P. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-P в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-PS. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-PS в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-VP. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-VP в антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-E-VP в антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-Z-VP в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-PS₂. Согласно одному

варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-PS₂ в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-PS₂. Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит 5'-дезоксид-5'-С-малонил в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q⁷ равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется

5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'OMe, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'OMe, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксид-5'-C-малонил.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1; при этом имеются две

фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой

нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных

связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезокси-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их

комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23

антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой

2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой

2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксид-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4

равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-C-малонил.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой

2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой

2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1. Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезокси-5'-С-малонил.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных

связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные

модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, q⁴ равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q⁷ равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксипентановую кислоту (5'-С-малонил).

Согласно одному варианту осуществления модифицировано 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% средства, представляющего собой dsRNA, по настоящему изобретению. Например, если модифицировано 50% средства, представляющего собой dsRNA, то 50% всех нуклеотидов, присутствующих в средстве, представляющем собой dsRNA, имеют модификацию, описанную в данном документе.

Согласно одному варианту осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нитей средства, представляющего собой dsRNA, независимо модифицирована с помощью ациклических нуклеотидов, LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксипентановой кислоты, 2'-фтора, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA), 2'-О-диметиламиноэтоксипентановой кислоты (2'-О-DMAEОЕ), 2'-О-аминопропила (2'-О-AP) или 2'-ара-Ф.

Согласно одному варианту осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нитей средства, представляющего собой dsRNA, имеет

по меньшей мере две разные модификации.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, формулы (I) дополнительно содержит 3'- и/или 5'-выступающий конец(концы), длина которого составляет 1-10 нуклеотидов. Согласно одному примеру средство, представляющее собой dsRNA, формулы (I) содержит 3'-выступающий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити. Согласно другому примеру средство, представляющее собой dsRNA, имеет 5'-выступающий конец на 5'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению не имеет какой-либо 2'-F-модификации.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить и/или антисмысловая нить средства, представляющем собой dsRNA, содержит один или несколько из блоков фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. Согласно одному примеру смысловая нить содержит один блок из двух фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. Согласно одному примеру антисмысловая нить содержит два блока из двух фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. Например, два блока из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей разделены 16-18 фосфатными межнуклеотидными связями.

Согласно одному варианту осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нитей средства, представляющего собой dsRNA, содержит 15-30 нуклеотидов. Согласно одному примеру смысловая нить содержит 19-22 нуклеотида, а антисмысловая нить содержит 19-25 нуклеотидов. Согласно другому примеру смысловая нить содержит 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит 23 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления нуклеотид в положении 1 от 5'-конца антисмысловой нити в дуплексе выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна из первой, второй и третьей пары оснований от 5'-конца антисмысловой нити представляет собой пару оснований AU.

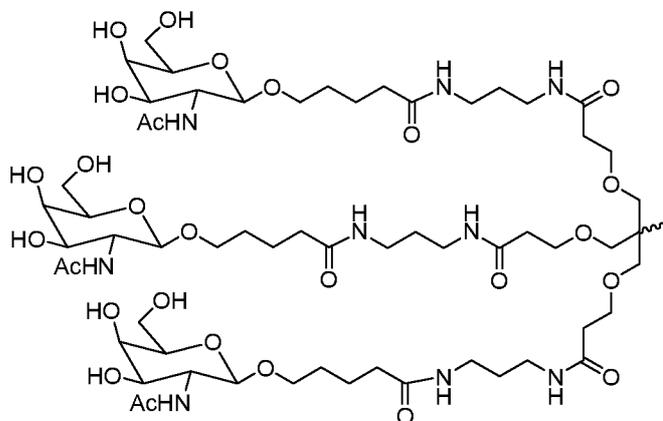
Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, по настоящему изобретению на 100% комплементарна целевой РНК, с которой она гибридизируется и подавляет ее экспрессию посредством РНК-интерференции. Согласно другому варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, по настоящему изобретению по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 55% или по меньшей мере на 50% комплементарна целевой РНК.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой dsRNA, определяемому в данном документе как способное подавлять экспрессию целевого гена. Средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один указанный нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити, или рядом с ним (т. е. в положении 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). Каждый из вариантов осуществления и аспектов, описанных в данном описании применительно к dsRNA, представленной формулой (I), можно также применять к dsRNA, содержащей нарушающий термостабильность нуклеотид.

Нарушающий термостабильность нуклеотид может встречаться, например, между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 21 нуклеотид. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе-модификации. Предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, разделены участком длиной 11 нуклеотидов. Например, две модифицированные нуклеиновые кислоты находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство,

представляющее собой dsRNA, дополнительно содержит по меньшей мере один лиганд ASGPR. Например, лиганд ASGPR представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного



линкера, как например:

Согласно одному варианту осуществления лиганд ASGPR присоединен к 3-концу смысловой нити.

Например, средство, представляющее собой dsRNA, определяемое в данном документе, может содержать i) фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити или антисмысловой нити; ii) две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити); и iii) лиганд, такой как лиганд ASGPR (например, одно или несколько производных GalNAc) на 5'-конце или 3'-конце смысловой нити или антисмысловой нити. К примеру, лиганд может находиться на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется

5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-OMe или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-OMe и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-OMe или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-OMe, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-OMe, n^5 равняется 3, B1'

представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на

3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23

антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации

межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-ОМе и q^7 равняется

1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-дезоксипентозу-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой

2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, B4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, T1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4

равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-PS

находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. Согласно одному варианту осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23

антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n² равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равняется 7, n⁴ равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равняется 4, q⁴ равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равняется 1, В4' представляет собой 2'-F и q⁷ равняется 1; при этом имеются две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство, представляющее собой dsRNA, также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд Согласно одному варианту осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, а нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

Согласно конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификациями в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23, а также 2'-F-модификациями в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-F-модификациями в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификациями в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями

нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-Оме-модификациями в положениях 1-6, 8, 10 и 12-21, 2'-F-модификациями в положениях 7 и 9 и дезоксинуклеотидом (например, dT) в положении 11 (считая от 5'-конца); и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-Оме-модификациями в положениях 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19-23, а также 2'-F-модификациями в положениях 2, 4-6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14 и 16-21, а также 2'-F-модификациями в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

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

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между

положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотриоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

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

(iv) фосфотриоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1, 3, 5-7, 9, 11-13, 15, 17-19 и 21-23, а также 2'-F-модификации в положениях 2, 4,

8, 10, 14, 16 и 20 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфотриоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

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

(iv) фосфотриоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 25 нуклеотидов;

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

(iii) фосфотриоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и

тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1-6, 8 и 12-21, а также 2'-F-модификациями в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15 и 17-23, а также 2'-F-модификациями в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного

линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1-6, 8 и 12-21, а также 2'-F-модификациями в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 23 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23, а также 2'-F-модификациями в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 21 и 22 и между положениями нуклеотидов 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно другому конкретному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 19 нуклеотидов;

(ii) лигандом ASGPR, присоединенным к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

(iii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1-4, 6 и 10-19, а также 2'-F-модификациями в положениях 5 и 7-9; и

(iv) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2 и между положениями нуклеотидов 2 и 3 (считая от 5'-конца);

и

(b) антисмысловую нить, характеризующуюся:

(i) длиной, составляющей 21 нуклеотид;

(ii) 2'-ОМе-модификациями в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21, а также 2'-F-модификациями в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (считая от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатными межнуклеотидными связями между положениями нуклеотидов 1 и 2, между положениями нуклеотидов 2 и 3, между положениями нуклеотидов 19 и 20 и между положениями нуклеотидов 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где средства, представляющие собой dsRNA, имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, описанные в данном документе, дополнительно содержат нарушающую термостабильность модификацию в положении 7, считая от 5'-конца антисмысловой нити, в положении 15, считая от 5'-конца смысловой нити, в положении 21, считая от 5'-конца смысловой нити, или их комбинации.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой dsRNA, способному подавлять экспрессию целевого гена. Средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один указанный нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити, или рядом с ним (т. е. в положении 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5-конца смысловой нити, если длина смысловой нити составляет 21 нуклеотид. Антисмысловая нить содержит две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе-модификации, разделенные участком длиной 11 нуклеотидов. Например, две модифицированные нуклеиновые кислоты находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, дополнительно содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к

эндонуклеазе, в сайте расщепления смысловой нити. Согласно одному примеру нуклеотид с модификацией, придающей чувствительный к эндонуклеазе, находится в положении 11 от 5'-конца смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить дополнительно содержит третий нуклеотид с модификацией, придающей нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему, при этом третий нуклеотид с модификацией находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой нити. Например, третий нуклеотид с модификацией находится в положении 10 от 5'-конца антисмысловой нити.

Варианты осуществления для нарушающих термостабильность нуклеотидов являются аналогичными различным вариантам осуществления, описанным выше для С1 в формуле (I). Варианты осуществления для модифицированных нуклеиновых кислот, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе-модификации, являются аналогичными разным вариантам осуществления, описанным выше для Т1', Т2' и Т3' в формуле (I). В данном случае применимы варианты осуществления, описывающие длину, выступающие концы, дополнительные модификации и конъюгации лигандов со средствами, представляющими собой dsRNA, формулы I выше.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, определяемого в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, для подавления экспрессии целевого гена *in vitro*.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, определяемого в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена у субъекта. Субъект может представлять собой любое животное, предпочтительно млекопитающее, более предпочтительно мышь, крысу, овцу, крупный рогатый скот, собаку, кошку или человека.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой dsRNA, способному подавлять

экспрессию целевого гена. Средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к эндонуклеазе (например, ДНК, РНК или 2'-F), рядом с сайтом расщепления смысловой нити. Например, нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к эндонуклеазе, находится в положении 11 от 5'-конца смысловой нити. Модификация, придающая чувствительность к эндонуклеазе, которая встречается рядом с сайтом расщепления, может оказывать влияние на чувствительность сайта расщепления. Например, нарушающие термостабильность модификации рядом с сайтом расщепления могут придавать сайту расщепления чувствительность к эндонуклеазам. Антисмысловая нить содержит две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе-модификации, разделенные участком длиной 11 нуклеотидов. Например, две модифицированные нуклеиновые кислоты находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении дополнительно предложен способ доставки средства, представляющего собой dsRNA, по настоящему изобретению к определенной мишени в субъекте путем подкожного или внутривенного введения. В настоящем изобретении дополнительно предложены средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению для применения в способе доставки указанных средств к определенной мишени в субъекте путем подкожного или внутривенного введения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигурах 1А-1С представлены диаграммы, показывающие эффект разных модификаций в положении 17 смысловой нити на *in vitro* эффективность, которую оценивали при 10 нМ и 0,1 нМ концентрации: (А) siRNA, целенаправленно воздействующих на mTTR, у которых смысловая нить с модификацией, не содержащей F, спарена с исходной AS-нитью; (В) siRNA, целенаправленно воздействующих на mTTR, у которых смысловая нить с модификацией, не содержащей F, спарена с AS-нитью с модификацией, не

содержащей F; (C) siRNA, целенаправленно воздействующих на ANG, AроС3 и TTRSC, у которых смысловая нить с модификацией, не содержащей F, спарена с исходной AS-нитью.

На фигуре 2 представлена диаграмма, показывающая эффект положения на *in vitro* эффективность для нарушающей термостабильность GNA-модификации в положениях 16-18 смысловой нити, которую оценивали при концентрациях, составляющих 10 нМ и 0,1 нМ.

На фигуре 3 представлена диаграмма, показывающая эффект модификаций в положении 2 антисмысловой нити на *in vitro* эффективность siRNA, целенаправленно воздействующих на mTTR, AроС3, TTRSC и TMP, которые оценивали при концентрациях, составляющих 10 нМ и 0,1 нМ.

На фигуре 4 представлена диаграмма, показывающая эффект модификаций в положении 14 антисмысловой нити на *in vitro* эффективность siRNA, целенаправленно воздействующих на mTTR, AроС3, TTRSC, которые оценивали при концентрациях, составляющих 10 нМ и 0,1 нМ.

На фигуре 5 представлен график, показывающий сайленсинг mTTR у мышей после SC введения однократной дозы, составляющей 2,5 мг/кг.

На фигуре 6 представлена диаграмма, показывающая эффект дозы при использовании siRNA с модификациями, содержащими F, AD-61398 и AD-64273, в сравнении с исходными последовательностями с 2 PS (AD-43527) и 6 PS (AD-57727); при этом осуществляли SC введение однократной дозы, а уровни белка измеряли через 96 ч. после введения дозы.

На фигуре 7 представлена диаграмма, показывающая снижение уровня белка mTTR в плазме после QW SC введения siRNA в дозе, составляющей 1 мг/кг, у мышей, при этом сравнивают AD-61398 с модификацией, не содержащей F, с исходным мотивом: AD-57727.

На фигуре 8 представлена диаграмма, показывающая сайленсинг мРНК TMPRSS6 после SC введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, у мышей (n=3/группа): сравнение конструкций с модификациями, не содержащими F, с исходным мотивом: AD-60490.

На фигуре 9 представлен график, показывающий сайленсинг мРНК

TMPRSS6 через 7 дней после SC введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, у мышей (n=3/группа): сравнение конструкций с модификациями, не содержащими F, с исходным мотивом: AD-60490.

На фигуре 10 показаны результаты *in vitro* активности для двух мотивов, мотива 1 и мотива 2, при этом активность сравнивали с исходным соединением AD-57727.

На фигуре 11 показана оценка *in vivo* активности сайленсинга у siRNA, целенаправленно воздействующих на mTTR.

На фигуре 12 показана усиленная активность при использовании конъюгатов со структурой, улучшающей стабильность (SEC-C), при этом образцы печени оценивали в отношении активности (мРНК) в день 7 после введения дозы.

На фигуре 13 изображена диаграмма, показывающая примерно 4-кратное увеличение активности при использовании новых мотивов (мотив 1 и 2) в сравнении с исходным соединением.

На фигуре 14 изображена диаграмма, показывающая существенно увеличенную продолжительность действия, обусловленную мотивом 1 и мотивом 2, для всех трех последовательностей.

На фигуре 15 изображен график, показывающий результаты для AroC3-GalNAc3 SAR при SC введении однократной дозы, составляющей 3 мг/кг hAAV 1×10^{11} GC/мышь.

На фигуре 16 представлено схематическое изображение Ago2 с включенной в него siRNA, а также 5'-винилфосфонат (5'-VP), модифицированный фосфат, имитирующий стабильный фосфат. 5'-фосфонат присоединяется под действием цитозольной Clp1-киназы и он действует в качестве ключевого якоря для включения в Ago2.

На фигуре 17 изображена диаграмма, показывающая, как присутствие 5'-VP в общем увеличивает *in vivo* активность. Оценивание проводили для четырех разных последовательностей, нацеленных на AroB. Уровни LDL через 7 дней после SC введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, анализировали для четырех конъюгатов (с 5'-VP-модификацией или без нее).

На фигуре 18 изображены разные химические модификации, которые могут замещать PS-связь и обеспечивать более стабильные химические структуры, в том числе фосфородитиоат (PS₂) и

метилфосфонат (MePhos), которые активируют эндогенное фосфорилирование.

На фигуре 19 показана диаграмма оценки *in vitro* концевых модификаций, в том числе 2'-OMe-MePhos, 2'-OMe-PS, dN(PS₂) и 2'-F-PS. Трансфекцию первичных мышечных гепатоцитов проводили с использованием двух конъюгатов, нацеленных на ApoB, при концентрации, составляющей 10 нМ и 0,1 нМ (n=4).

На фигуре 20 показаны две диаграммы, показывающие как незначительное изменение на 5'-конце антисмысловой нити может значительно увеличивать *in vivo* эффективность. На диаграмме слева показано, что 2'-F-PS в положении 1 антисмысловой нити может увеличивать активность 5'-P-зависимых последовательностей (при SC введении однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, и активность F9 измеряли в день 3). На диаграмме справа показано ~3-кратное увеличение эффективности, обусловленное dN(PS)₂, по сравнению с исходной конструкцией, аналогичное VP (при SC введении однократной дозы, составляющей 10 мг/кг, и уровень LDL измеряли в день 3 для определения ApoB).

На фигурах 21A-B показан SAR-анализ сравнения *in vitro* и *in vivo* активности siRNA, нацеленных на ApoB, которые содержат 5'-OH- и 5'-E-VP-модификацию (на 5'-конце антисмысловой нити). На фигуре 21A показаны результаты *in vitro* трансфекции мышечных 1° гепатоцитов. На фигуре 21B показаны уровни LDL через 3 дня после введения однократной дозы (SC введение дозы).

На фигуре 22 показаны результаты сравнения *in vitro* эффективности 5'-E-VP-модификации и 5'-Z-VP-модификации у конъюгатов siRNA-GalNAc, нацеленных на mTTR и F9. Результаты получили в результате *in vitro* трансфекции мышечных первичных гепатоцитов.

На фигуре 23 показаны результаты сравнения *in vivo* активности 5'-E-VP-модификации и 5'-Z-VP-модификации у конъюгата siRNA-GalNAc, нацеленного на F9 (SC введение однократной дозы).

На фигурах 24A-C представлены графики, показывающие эффект дозы siRNA, нацеленных на PTEN, с (A) 5'-OH, (B) 5'-C-малонилом и (C) 5'-фосфатом на первичных мышечных гепатоцитах в анализе *in vitro* сайленсинга PTEN. Все значения получены в результате

проведения экспериментов в трех повторностях.

На фигуре 25 показаны результаты устойчивости к ферментам у siRNA с 5'-ОН, 5'-С-малонилом и 5'-фосфатом, которые инкубировали с тритосомами печени крыс. Целевые последовательности для siRNA показаны в таблице 10. Данные нормализовали относительно необработанных контролей.

На фигуре 26 показаны результаты включения в RISC siRNA с 5'-ОН, 5'-С-малонилом и 5'-фосфатом (5'-модификация в антисмысловых нитях), как определено по иммунопреципитации Ago2 из первичных мышинных гепатоцитов и путем амплификации с помощью RT-PCR одиночных нитей, включенных в Ago2. Уровни эндогенных miR122 определяли в качестве контроля. Целевые последовательности для siRNA показаны в таблице 10.

На фигуре 27 представлен график, показывающий *in vitro* нокдаун TTR при использовании siRNA, модифицированной одним нуклеотидом (S)-GNA. Уровни мРНК TTR измеряли в первичных мышинных гепатоцитах после инкубации с 10 нМ siRNA в течение 24 часов. Уровни мРНК TTR оценивали с использованием RT-qPCR и нормализовали относительно клеток, обработанных PBS. Все результаты представляли собой среднее значение четырех измерений.

На фигуре 28А представлен график, показывающий *in vitro* нокдаун TTR при использовании siRNA, модифицированной одной парой оснований (S)-GNA. Уровни мРНК TTR измеряли в первичных мышинных гепатоцитах после инкубации с 10 нМ siRNA в течение 24 часов. Уровни мРНК TTR оценивали с использованием RT-qPCR и нормализовали относительно клеток, обработанных PBS. Все результаты представляли собой среднее значение четырех измерений. На фигуре 28В показаны дуплексы, полученные посредством комбинирования, в которых смысловая и антисмысловая нити, содержащие одиночные нуклеотиды (S)-GNA, были спарены в виде гетерологичных пар оснований GNA:RNA.

На фигуре 29 представлен график, показывающий *in vivo* уровни TTR в сыворотке мышей. Животные получали однократную дозу siRNA, составляющую 2,5 мг/кг. В указанные моменты времени до и после введения дозы у животных проводили отбор крови и образцы

сыворотки анализировали с использованием анализа сэндвич-ELISA, в котором использовали антитело, конъюгированное с HRP, и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для считывания показаний при 450 нм. Все образцы анализировали в двух повторностях и каждый результат представлял собой среднее значение для мышей в каждой когорте (n=3).

На фигуре 30 представлен график, показывающий *in vivo* количественное определение уровней мРНК TTR. Животные получали однократную дозу siRNA, составляющую 2,5 мг/кг. В указанные моменты времени после введения доз осуществляли экстрагирование РНК из гомогената печени. мРНК TTR оценивали как описано выше с помощью RT-qPCR, используя способ $\Delta\Delta C_t$ с GAPDH в качестве контрольного транскрипта, и нормализовали относительно животных, обработанных PBS. Закрашенные столбцы показывают результаты для дня 21, а незакрашенные столбцы показывают результаты для дня 7.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что присутствие 2'-Оме-модификаций в положениях нуклеотидов 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити ослабляет активность сайленсинга генов у средства, представляющего собой dsRNA. Путем введения химических модификаций в 2'-положение или в эквивалентные положения в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, которые придают меньший стерический объем, чем 2'-Оме-модификация, в определенных положениях в антисмысловой и/или смысловой нити средства, представляющие собой dsRNA, были способны восстанавливать активность сайленсинга генов. Авторы настоящего изобретения также определили, что введение нарушающего термостабильность нуклеотида в смысловую нить в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити (т. е. в положения 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити) обеспечивает усиленную активность сайленсинга генов.

Смысловая нить и антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, могут быть полностью модифицированными. Средство, представляющее собой dsRNA, необязательно конъюгируют с лигандом асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR), к примеру со смысловой нитью. Получаемые в

результате средства, представляющие собой dsRNA, характеризуются эффективной активностью *in vivo* сайленсинга генов.

Соответственно, в настоящем изобретении предложено двухнитевое средство (dsRNA) для RNAi, способное к подавлению экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства, представляющего собой dsRNA, может варьироваться от 12 до 40 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-40 нуклеотидов, 17-37 нуклеотидов, 25-37 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют дуплексную dsRNA. Длина дуплексного участка средства, представляющего собой dsRNA, может составлять 12-40 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-40 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 25-35 пар нуклеотидов, 27-35 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере длина дуплексного участка выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 пар нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, может содержать один или несколько выступающих участков и/или кэпирующих групп на 3'-конце или 5'-конце или обоих концах нити в средстве, представляющем собой dsRNA. Длина выступающего конца может составлять 1-10 нуклеотидов, 1-6 нуклеотидов, к примеру, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Выступающие концы могут быть обусловлены тем, что одна нить длиннее другой, или быть обусловлены тем, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые происходит

нацеливание, или он может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием "шпильки" или с помощью других не содержащих оснований линкеров.

Согласно одному варианту осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства, представляющего собой dsRNA, независимо может представлять собой нуклеотид с модификацией, в том числе без ограничения с 2'-модификацией сахара, например, 2-Ф, 2'-О-метил, тимидин (Т), 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и любые их комбинации, или нуклеотид без модификации. Например, последовательность выступающего конца на обоих концах каждой нити может быть ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарен последовательностям генов, на которые происходит нацеливание, или он может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства, представляющего собой dsRNA, могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий участок содержит два нуклеотида с фосфоротиоатной связью между этими двумя нуклеотидами, при этом эти два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному варианту осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. Согласно одному варианту осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. Согласно одному варианту осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению может содержать только один выступающий конец, который может усиливать активность интерференции у dsRNA без воздействия на его общую стабильность. Например, однонитевой выступающий конец может быть расположен на 3'-терминальном конце смысловой нити или, в качестве альтернативы на 3'-терминальном конце антисмысловой нити. dsRNA также может иметь тупой конец,

расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити), или наоборот. Как правило, антисмысловая нить dsRNA имеет выступающий конец из нуклеотидов на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступающий конец антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC. Например, длина одного выступающего конца составляет по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению может также иметь два тупых конца на обоих концах dsRNA-дуплекса.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению представляет собой олигомер с двумя тупыми концами, длина которого составляет 19 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити), или рядом с ним. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе; предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению представляет собой олигомер с двумя тупыми концами, длина которого составляет 20 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку

антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити), или рядом с ним. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе; предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению представляет собой олигомер с двумя тупыми концами, длина которого составляет 21 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити), или рядом с ним. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе; предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит смысловую нить, длина которой составляет 21 нуклеотид (нт), и антисмысловую нить, длина которой составляет 23 нуклеотида (нт), где смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити), или рядом с ним. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити, если длина

смысловой нити составляет 21 нуклеотид. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе; предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити, где один конец dsRNA является тупым концом, тогда как другой конец содержит выступающий конец из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити. Необязательно dsRNA дополнительно содержит лиганд (предпочтительно лиганд рецептора, т. е. лиганд ASGPR).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, считая от 5'-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1-23 указанной смысловой нити содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, считая от 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 тем самым 3'-однонитевой выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, образуя тем самым 5'-однонитевой выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, если смысловая и антисмысловая нити выровнены с обеспечением максимальной комплементарности, образуя тем самым практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой нити для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухнитевой

нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид встречается в сайте, противоположном затравочному участку антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). или рядом с ним. Например, нарушающий термостабильность нуклеотид встречается между положениями 14-17 от 5'-конца смысловой нити Антисмысловая нить содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе; предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где указанное средство, представляющее собой dsRNA, содержит смысловую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, при этом смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к расщеплению ферментом, в положении 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, которые находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити; где указанный 3'-конец указанной смысловой нити и указанный 5'-конец указанной антисмысловой нити образуют тупой конец, при этом указанная антисмысловая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем смысловая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов по длине указанной антисмысловой нити, чтобы снизить экспрессию целевого гена при введении средства, представляющего собой dsRNA, в клетку млекопитающего, и где расщепление указанной dsRNA при помощи Dicer предпочтительно приводит к siRNA, содержащей указанный 3'-конец

указанной антисмысловой, со снижением тем самым экспрессии целевого гена у млекопитающего. Средство, представляющее собой dsRNA, необязательно дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить содержит нуклеотид с модификацией, придающей чувствительность к расщеплению ферментом, в положении 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находящиеся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить содержит две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, находящиеся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства, представляющего собой dsRNA, может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован с помощью одинаковых или различных модификаций, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих не образующих связь атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких образующих связь атомов кислорода фосфата; изменение составного элемента рибозного сахара, например, 2-гидроксила на рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента на "дефосфоризованные" линкеры; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома O фосфатного фрагмента. 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, фосфоротиоатная модификация в положении не образующего связь атома 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 создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения нуклеотидов с модификациями или имитаторов нуклеотидов в однонитевые выступающие концы, например, в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может быть желательно включать в выступающие концы пуриновые нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут предусматривать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с помощью модификаций, известных из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F) - или 2'-O-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификаций фосфатной группы, например, фосфоротиоатных модификаций. Выступающие концы не обязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

Согласно одному варианту осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-O-метила, 2'-O-аллила, 2'-C-аллила, 2'-дезоксидезокси или 2'-фтора. Нити могут содержать более одной модификации. Согласно одному варианту осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити

независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут представлять собой 2'-дезоксидезокси-, 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие.

Согласно одному варианту осуществления каждая смысловая нить и антисмысловая нить содержит по два нуклеотида с разными модификациями, выбранными из 2'-О-метила или 2'-дезоксидезокси-.

Согласно одному варианту осуществления каждый остаток в смысловой нити и в антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метилнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксифторнуклеотида, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA) нуклеотида, 2'-О-диметиламиноэтоксипропил (2'-О-DMAEOE) нуклеотида, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) нуклеотида или 2'-ара-Ф-нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит модификации в виде чередующегося паттерна, в частности, в участках B1, B2, B3, B1', B2', B3', B4', показанных в формуле I. Термин "чередующийся мотив" или "перемежающийся паттерн", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, причем каждая модификация встречается в чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ..." 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 смысловая нить или антисмысловая нить может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, как, например,

"АВАВАВ...", "АСАСАС...", "BDBDBD..." или "CDCDCD..." и т. д.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению характеризуется паттерном модификаций в виде чередующегося мотива на смысловой нити, сдвинутым относительно паттерна модификации в виде чередующегося мотива на антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной иным способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и наоборот. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в dsRNA-дуплексе чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" в направлении от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" в направлении от 3'- к 5'-концу нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" в направлении от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" в направлении от 3'- к 5'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

Средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфоротиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться на любом нуклеотиде смысловой нити, или антисмысловой нити, или обеих нитей в любом положении нити. К примеру, модификация межнуклеотидной связи может встречаться на каждом нуклеотиде в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут иметь обе модификации межнуклеотидной связи в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций

межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок содержит два нуклеотида с фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексного участка. 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, может присутствовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Предпочтительно эти три концевые нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления смысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит 1-10 блоков из двух - десяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая нить спарена с антисмысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфотиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из трех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфотиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из четырех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфотиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из шести фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из семи фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из

восьми фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей какую-либо комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления антисмысловая нить средства, представляющего собой dsRNA, содержит два блока из девяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещается в каком-либо положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить является спаренной со смысловой нитью, содержащей комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфоротиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 концевых положений смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или обоих концах смысловой и/или антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 остатков внутреннего участка дуплекса каждой из смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть соединены посредством

фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8-16 дуплексного участка, считая от 5'-конца смысловой нити; при этом средство, представляющее собой dsRNA, необязательно может дополнительно содержать одну или несколько фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах 1-10 концевых положений.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные или метилфосфонатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой

нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две

фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 (считая от 5'-конца) смысловой нити, а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 (считая от 5'-конца) смысловой нити, а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1

и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную

модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 22 и 23 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца).

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит ошибочное спаривание(я) с мишенью, в пределах дуплексах или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их способности содействовать диссоциации или

плавлению (например, исходя из свободной энергии ассоциации или диссоциации для конкретного спаривания, при этом наиболее простым подходом является исследование пар по отдельности для каждой пары, хотя также можно применять анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: А:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других местах данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных участков, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, которые независимо могут быть выбраны из группы, состоящей из: А: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.

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

Авторы настоящего изобретения установили, что введение нуклеотида с 4'-модификацией и/или 5'-модификацией в 3'-конец фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) и/или фосфородитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении однонитевого или двухнитевого олигонуклеотида может оказывать

стерический эффект на межнуклеотидную связь и, следовательно, защитить ее от действия нуклеаз или сделать устойчивой к ним.

Согласно одному варианту осуществления 5'-модифицированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. К примеру, 5'-алкилированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в положении 5' рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

Согласно одному варианту осуществления 4'-модифицированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. К примеру, 4'-алкилированный нуклеозид вводят в 3'-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в положении 4' рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. В качестве альтернативы 4'-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен в 3'-конец динуклеотида в любое положение однонитевой или двухнитевой siRNA. 4'-*O*-алкил рибозного сахара может быть рацемическим или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

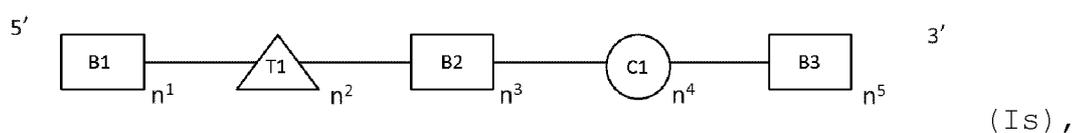
Согласно одному варианту осуществления 5'-алкилированный нуклеозид вводят в какое-либо положение на смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 5'-алкил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым *R*- или *S*-изомером.

Согласно одному варианту осуществления 4'-алкилированный

нуклеозид вводят в какое-либо положение на смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 4'-алкил может быть или рацемическим, или хирально чистым R- или S-изомером. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым R- или S-изомером.

Согласно одному варианту осуществления 4'-O-алкилированный нуклеозид вводят в какое-либо положение на смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация сохраняет или увеличивает эффективность dsRNA. 5'-алкил может быть или рацемическим, или хирально чистым R- или S-изомером. Иллюстративный 4'-O-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-O-метилнуклеозид. 4'-O-метил может быть или рацемическим, или хирально чистым R- или S-изомером.

Согласно одному варианту осуществления последовательность смысловой нити dsRNA представлена формулой (Is):



где

каждый из B1, B2, B3 независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид (например, ациклический нуклеотид, такой как UNA или GNA, ошибочно спаренный нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием или ДНК), расположенный напротив затравочного участка антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити);

T1 представляет собой нуклеотид, имеющий химическую модификацию в положении 2' или аналогичном положении в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или в остове нуклеотида, которая придает нуклеотиду меньший стерический объем, чем 2'-OMe-модификация; например, T1 выбран

из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

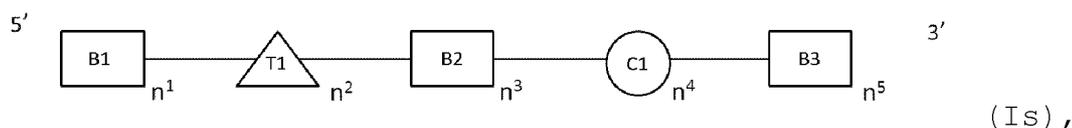
длина n^1 или n^3 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 составляет 1-6 нуклеотидов;

длина n^4 составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0, и

длина n^2 составляет 0-3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления последовательность смысловой нити средства, представляющего собой dsRNA, длина которой составляет 19, 20, 21 или 22 нуклеотидов, представлена формулой (Is):



где

каждый из B1, B2, B3 независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид (например, ациклический нуклеотид, такой как UNA или GNA, ошибочно спаренный нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием или ДНК), расположенный напротив затравочного участка антисмысловой нити (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити);

T1 представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина n^1 или n^3 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 составляет 1-6 нуклеотидов;

длина n^4 составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0, и

длина n^2 составляет 0-3 нуклеотида.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, формулы (Is) дополнительно содержит

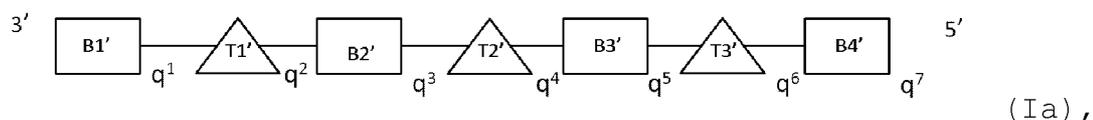
3'- и/или 5'-выступающий конец(концы), длина которого составляет 1-10 нуклеотидов. Согласно одному примеру средство, представляющее собой dsRNA, формулы (Is) содержит 5'-выступающий конец.

Согласно одному варианту осуществления C1 предусматривает один нарушающий термостабильность нуклеотид в положении 14, 15, 16 или 17 от 5'-конца смысловой нити. Например, C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA), ошибочно спаренный нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием или ДНК. Согласно одному конкретному примеру C1 представляет собой GNA.

Согласно одному варианту осуществления T1 предусматривает ДНК, РНК, LNA, 2'-F или 2'-F-5'-метил в положении 11 от 5'-конца смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению содержит смысловую нить (Is), где C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA), ошибочно спаренный нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием или DNA; и T1 предусматривает ДНК, РНК, LNA, 2'-F или 2'-F-5'-метил в положении 11 от 5'-конца смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления последовательность антисмысловой нити средства, представляющего собой dsRNA, представлена формулой (Ia):



где

каждый из B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

каждый T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий химическую модификацию в положении 2' или аналогичном положении в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или в остове нуклеотида, которая придает

нуклеотиду меньший стерический объем, чем 2'-ОМе-модификация; например, каждый T1', T2' и T3' выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина q¹ независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов.

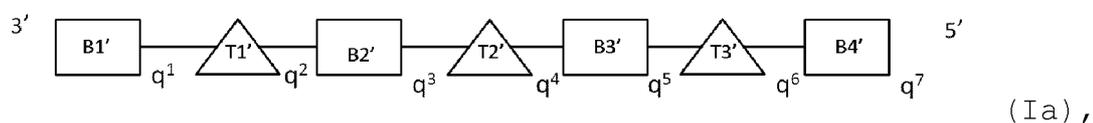
длина q³ или q⁷ независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

длина q² или q⁶ независимо составляет 1-3 нуклеотида;

длина q⁴ независимо составляет 0-3 нуклеотида; и

длина q⁵ независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления последовательность антисмысловой нити средства, представляющего собой dsRNA, длина которой составляет 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, представлена формулой (Ia):



где

каждый из B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

каждый из T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина q¹ независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов.

длина q³ или q⁷ независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

длина q² или q⁶ независимо составляет 1-3 нуклеотида;

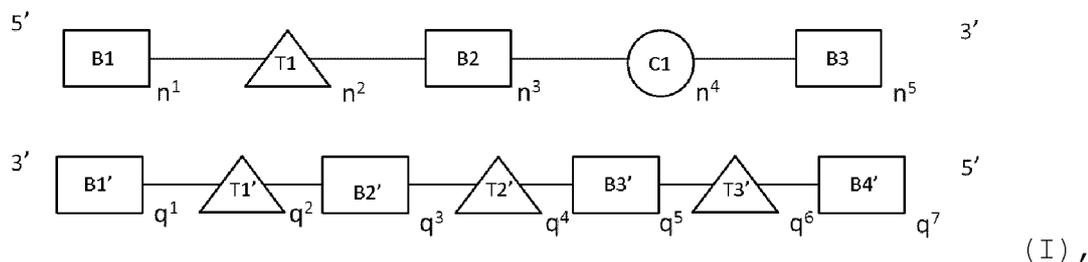
длина q⁴ независимо составляет 0-3 нуклеотида; и

длина q⁵ независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

Согласно одному варианту осуществления dsRNA формулы (Ia) дополнительно содержит 3'- и/или 5'-выступающий конец(концы), длина которого составляет 1-10 нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления dsRNA формулы (Ia) содержит 3'-выступающий конец.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство,

представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA);

каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

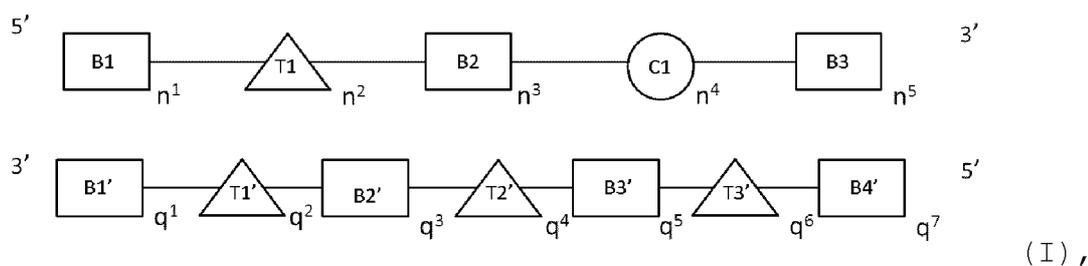
длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 3'- и/или 5'-выступающий конец(концы) длиной 1-10 нуклеотидов в антисмысловой и/или смысловой нити(ях).

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA);

каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

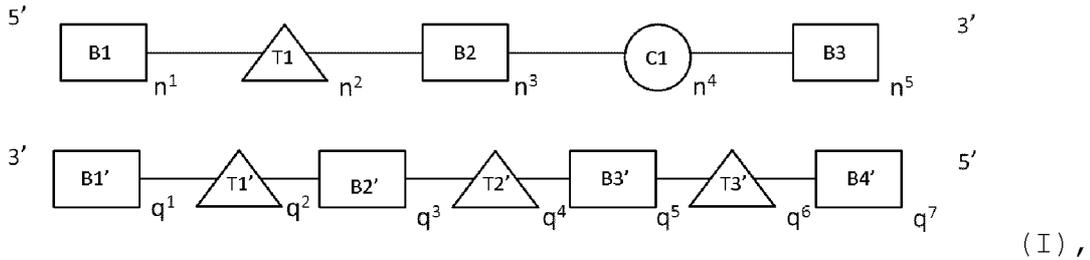
длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 3'-выступающий конец длиной 2 нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию 2'-ОМе;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид GNA;

каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой ДНК или РНК;

длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

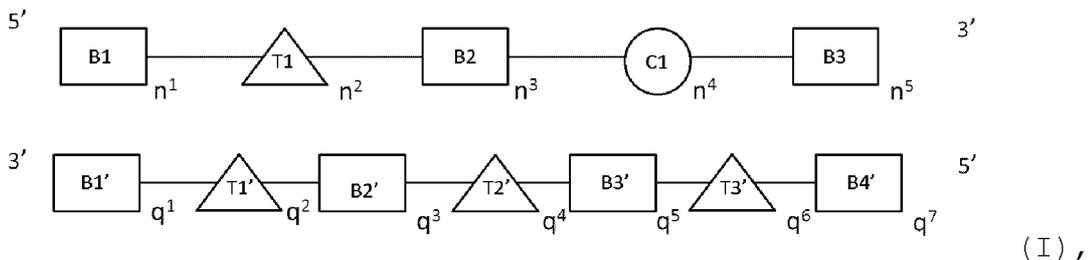
длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 3'-выступающий конец длиной 1-6 нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит 19-23 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий 2'-ОМе-модификацию;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид GNA;

T1, T1', T2' и T3' независимо представляют собой ДНК или РНК;

длина n^1 , n^3 , q^1 или q^3 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

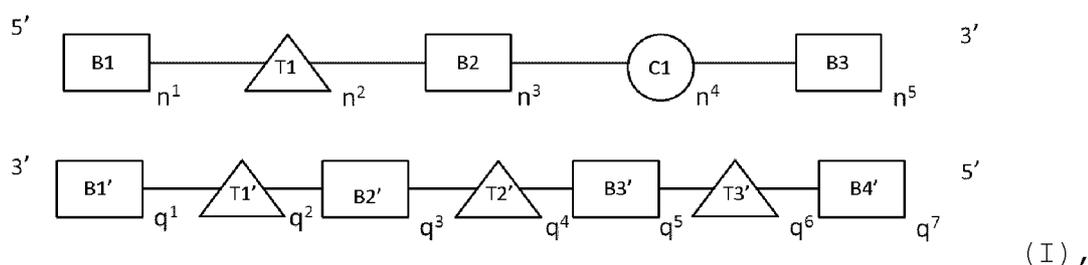
длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 , q^4 или q^5 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 3'-выступающий конец длиной 2 нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA);

каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15

нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

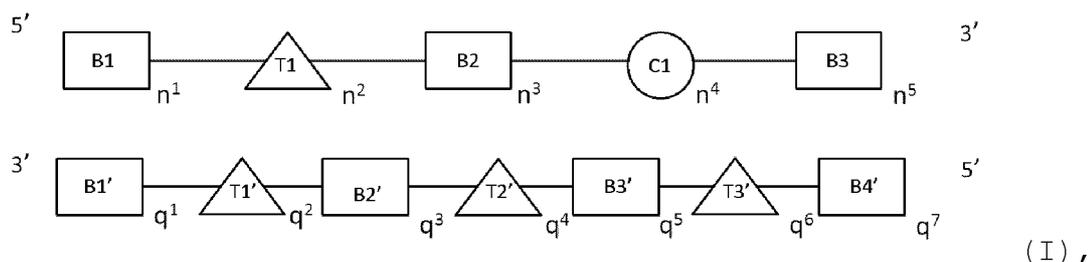
длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 5'-выступающий конец длиной 1-10 нуклеотидов на 5'-конце смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство, представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов:



где

каждый из $B1$, $B2$, $B3$, $B1'$, $B2'$, $B3'$ и $B4'$ независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

$C1$ представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA или GNA);

каждый из $T1$, $T1'$, $T2'$ и $T3'$ независимо представляет собой нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

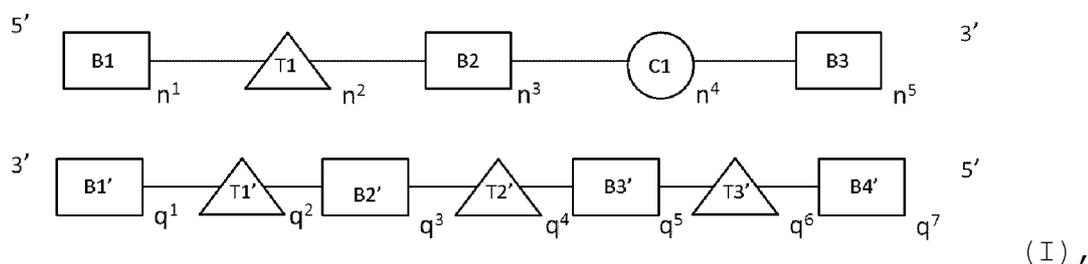
длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотидов; в качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;
 длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и
 где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 5'-
 выступающий конец длиной 1-6 нуклеотидов на 5'-конце смысловой
 нити.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение
 относится к средству, представляющему собой двухнитевую РНК
 (dsRNA), для подавления экспрессии целевого гена. Средство,
 представляющее собой двухнитевую dsRNA, содержит смысловую нить
 и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40
 нуклеотидов:



где

каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо
 представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из
 группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-
 замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA;

C1 представляет собой ациклический нуклеотид (например, UNA
 или GNA);

каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой
 нуклеотид, содержащий химическую модификацию, выбранную из
 группы, состоящей из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила;

длина n^1 , n^3 или q^1 независимо составляет от 4 до 15
 нуклеотидов;

длина n^5 , q^3 или q^7 независимо составляет 1-6 нуклеотидов;

длина n^4 , q^2 или q^6 независимо составляет 1-3 нуклеотида; в
 качестве альтернативы n^4 равняется 0,

длина n^2 или q^4 независимо составляет 0-3 нуклеотида;

длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов; и

где средство, представляющее собой dsRNA, имеет 5'-
 выступающий конец длиной 1-10 нуклеотидов на 5'-конце смысловой

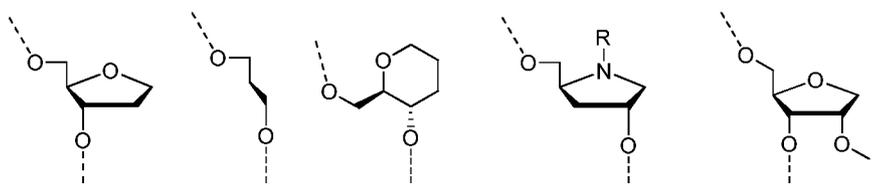
нити и 3'-выступающий конец длиной 1-10 нуклеотидов на 5'-конце антисмысловой нити.

Нарушающие термостабильность модификации

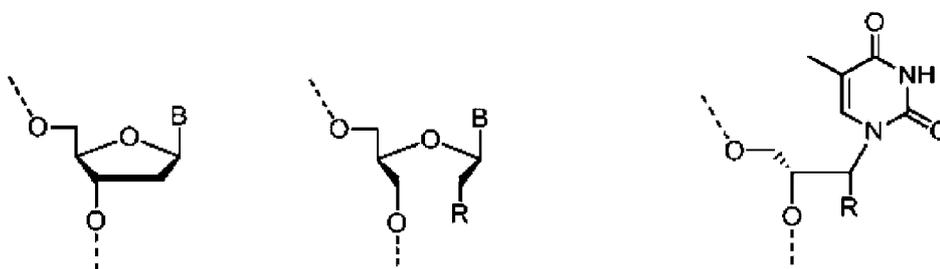
Средство, представляющее собой dsRNA, можно оптимизировать для РНК-интерференции путем повышения подверженности dsRNA-дуплекса диссоциации или плавлению (снижая свободную энергию ассоциации дуплекса) путем введения нарушающей термостабильность модификации в смысловую нить в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой нити (т. е., в положения 2-8 от 5'-конца антисмысловой нити). Данная модификация может увеличивать подверженность дуплекса диссоциации или плавлению в затравочном участке антисмысловой нити.

Нарушающие термостабильность модификации могут включать модификацию с удалением азотистого основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом противоположной цепи; и модификацию сахаров, такую как 2'-дезоксидификация или ациклический нуклеотид, например, незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA).

Иллюстративные модификации с удалением азотистого основания представляют собой:



Иллюстративные модификации сахаров представляют собой:



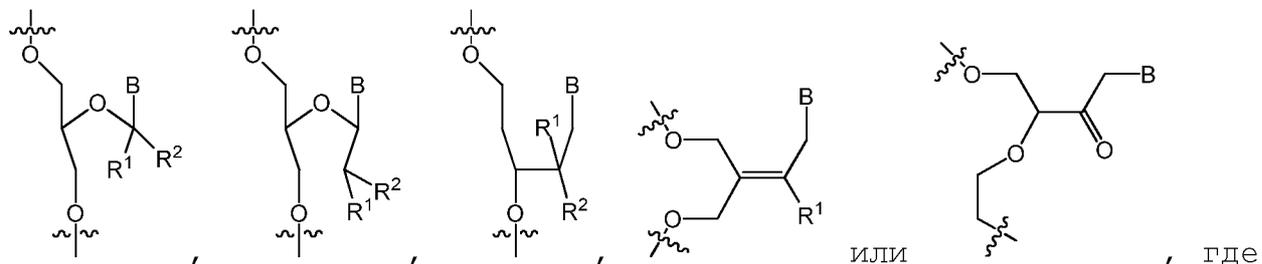
2'-дезоксид

незапертая нуклеиновая кислота
R=H, OH, O-алкил

глицериновая нуклеиновая кислота
R=H, OH, O-алкил

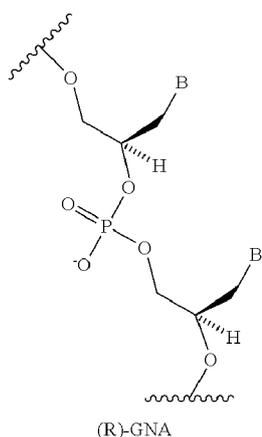
Термин "ациклический нуклеотид" относится к любому нуклеотиду с ациклическим рибозным сахаром, например, в котором любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-

C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует и/или в нуклеотиде отсутствует по меньшей мере один из атомов углерода или атом кислорода рибозы (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления ациклический нуклеотид представляет собой



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R¹ и R² независимо представляют собой H, галоген, OR₃ или алкил; и R₃ представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Термин "UNA" относится к незапертой ациклической нуклеиновой кислоте, в которой какая-либо из связей в сахаре была удалена с образованием незапертого "сахарного" остатка. Согласно одному примеру UNA также охватывает мономеры, у которых удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). Согласно другому примеру связь C2'-C3' (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') в сахаре удалена (см. Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не оказывая влияние на спаривание оснований по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством связи 2'-5' или 3'-5'.

Термин 'GNA' относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся от них составом своего "остова", поскольку его составляют повторяющиеся единицы глицерина, соединенные фосфодиэфирными связями:



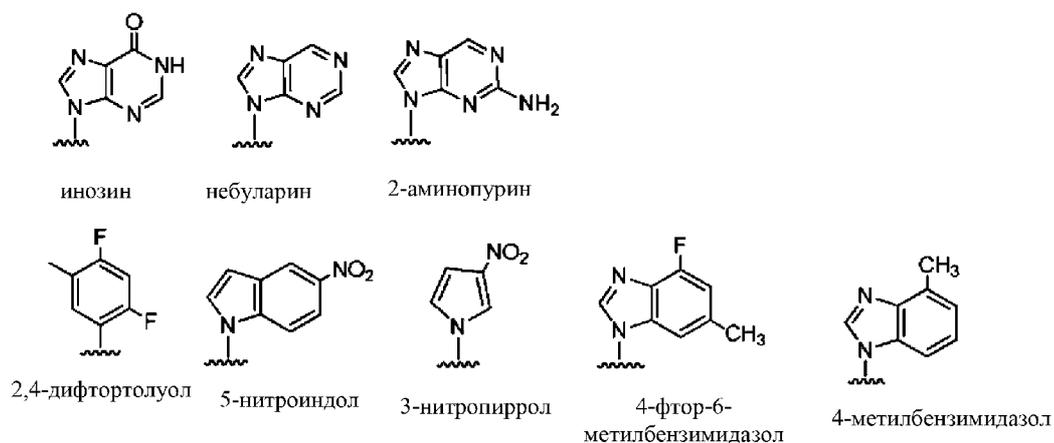
Нарушающая термостабильность модификация может представлять собой ошибочные спаривания (т. е. некоплементарные пары оснований) между нарушающим термостабильность нуклеотидом и противоположным нуклеотидом противоположной нити dsRNA-дуплекса. Иллюстративные ошибочно спаренные пары оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинацию. Другие типы ошибочного спаривания оснований, известные из уровня техники, также применимы в настоящем изобретении. Может встречаться ошибочное спаривание между нуклеотидами, которые представляют собой как встречающиеся в природе нуклеотиды, так и нуклеотиды с модификацией, т. е. может встречаться ошибочное спаривание оснований у нуклеиновых оснований соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций, присутствующих на рибозных сахарах нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления средство, представляющее собой dsRNA, содержит по меньшей мере одно ошибочно спаренное нуклеиновое основание, то есть 2'-дезоксирибонуклеотид; например, 2'-дезоксирибонуклеотид в смысловой нити.

Большее число примеров нуклеотидов с удаленным азотистым основанием, модификаций в виде ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций, представляющих собой ошибочное спаривание, описано подробно в документе WO 2011/133876, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

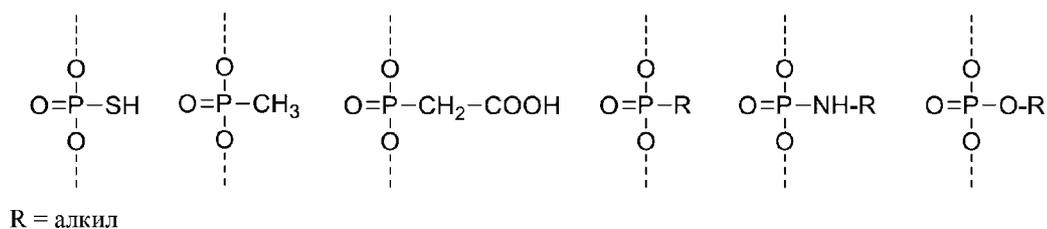
Нарушающие термостабильность модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями

противоположной нити, а также фосфатные модификации.

Модификации нуклеиновых оснований с ослабленной или полностью утраченной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной нити были исследованы в отношении дестабилизации центрального участка dsRNA-дуплекса, как описано в документе WO 2010/0011895, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:



Иллюстративные фосфатные модификации, которые, как известно, снижают термостабильность dsRNA-дуплексов в сравнении с природными фосфодиэфирными связями, представляют собой:



Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению может содержать 2'-5' связи (с 2'-H, 2'-OH и 2'-OMe, а также с P=O или P=S). Например, модификации 2'-5' связей можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой и антисмысловой нитей, или их можно использовать на 5'-конце смысловой нити для предупреждения активации смысловой нити под действием RISC.

Согласно другому варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению может

содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-Н, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, модификации L-сахаров можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой и антисмысловой нитей, или их можно использовать на 5'-конце смысловой нити для предупреждения активации смысловой нити под действием RISC.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленные формулой (I), где указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно указанный мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждое средство, представляющее собой dsRNA, может целенаправленно воздействовать на один ген или на два различных гена; или каждое средство, представляющее собой dsRNA, может целенаправленно воздействовать на один ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (I), где указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно указанный мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждое средство, представляющее собой dsRNA, может целенаправленно воздействовать на один ген или на два различных гена; или каждое средство, представляющее собой dsRNA, может целенаправленно воздействовать на один ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту осуществления два средства, представляющих собой dsRNA, представленные формулой (I), соединены вместе на 5'-конце, а один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждая dsRNA может целенаправленно воздействовать на один ген или на два различных гена; или каждая dsRNA может целенаправленно воздействовать на один ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные siRNA, и все их можно применять в случае dsRNA по настоящему изобретению. Такие

публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

В случае средства, представляющего собой dsRNA, которое содержит один или несколько углеводных фрагментов, конъюгированных со средством, представляющим собой dsRNA, может усиливаться одно или несколько свойств средства, представляющего собой dsRNA. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства, представляющего собой dsRNA. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства, представляющего собой dsRNA, можно замещать другим фрагментом, например, неуглеводным (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 путем замещения рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т. е. один или несколько атомов в кольце могут представлять собой гетероатом, например, атом азота, кислорода, серы. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую 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, относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или в целом к связи, предусмотренной для введения носителя в остов и которая подходит

для этого, например, к фосфату или модифицированному фосфату, например, серосодержащей остовой связи рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в кольцо атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно, выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или в целом обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, с атомом, входящим в состав кольца.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, конъюгируют с лигандом через носитель, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; 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 серинолового остова или диэтаноламинового остова.

Средство, представляющее собой двухнитевую РНК (dsRNA), по настоящему изобретению необязательно может быть конъюгировано с одним или несколькими лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или к обеим нитям на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах. К примеру, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью, в частности, с 3'-концом смысловой нити.

Согласно одному варианту осуществления средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению являются

5'-фосфорилированными или включают фосфорильный аналог на 5' (штрих)-конце. 5'-фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-гуанозинный кэп (7-метилированный или неметилированный) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозинный кэп (Appp) и любую модифицированную или немодифицированную кэп-структуру нуклеотида (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфоротиолат ((HO)₂(O)P-S-5'); любую дополнительную комбинацию кислород/сера-замещенных монофосфата, дифосфата и трифосфатов (например 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т. д.), 5'-фосфорамидаты ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т. д, например, RP(OH)(O)-O-5'-, 5'-алкенилфосфонаты (т. е. винил, замещенный винил), (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-алкилэфирфосфонатов (R=алкиловый эфир=метоксиметил (MeOCH₂-), этоксиметил и т. д., например, RP(OH)(O)-O-5'-). Согласно одному примеру модификацию можно поместить в антисмысловую нить средства, представляющего собой dsRNA.

Лиганды

Широкий спектр химических структурных элементов можно соединять с олигонуклеотидами по настоящему изобретению. Предпочтительные фрагменты представляют собой лиганды, которые соединяют, предпочтительно ковалентно, или непосредственно, или опосредованно через промежуточный связывающий фрагмент.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд меняет распределение, нацеливание или время жизни молекулы, в которую он введен. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например, клеточного компартмента или компартмента органа, ткани, органа или участка

тела, например, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой лиганд. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

Некоторые лиганды могут обладать эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет рН-зависимую мембранную активность и фузогенность. Согласно одному варианту осуществления эндосомолитический лиганд принимает свою активную конформацию при значении рН эндосомы. "Активной" конформацией является такая конформация, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68, которая включена посредством ссылки во всей ее полноте). Согласно одному варианту осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), у которой будет меняться заряд или протонирование в ответ на изменения значения рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

Лиганды могут улучшать транспортировку, гибридизацию и свойства специфичности и могут также улучшать устойчивость к нуклеазам у полученного естественного или модифицированного олигорибонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

Лиганды, как правило, могут включать терапевтически активные

модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для отслеживания распределения; сшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

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

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, 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, сурфактантный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат,

полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер. В таблице 2 показаны некоторые примеры нацеливающих лигандов и ассоциированных с ними рецепторов.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), кросс-линкеры (например, псорален, митомицин C), порфирины (TRPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил) глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин, а также пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/абсорбции (например, аспирин, витамин E, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu³⁺ 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, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза

или аптамеры. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение клеткой средства для РНК-интерференции, 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 А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

Лиганд может увеличивать поглощение олигонуклеотида клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лиганды, которые будут обладать таким эффектом, включают фактор некроза опухолей альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1-бета или гамма интерферон.

Согласно одному аспекту лиганд 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). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевую ткань, например, отличную от ткани почки целевую ткань организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные 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 (a) повышать устойчивость конъюгата к разрушению, (b) усиливать нацеливание или транспортировку 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 модулирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, которые связываются с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на

основе липида, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

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

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

Согласно другому аспекту лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Это особенно применимо при лечении нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HAS, липопротеин низкой плотности (LDL) и липопротеин высокой плотности (HDL).

Согласно другому аспекту 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 antennapedia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, при этом средство может включать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, и также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет

собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазами.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, аналогичную естественному пептиду. Длина пептидного фрагмента или фрагмента-пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий преимущественно из Tyr, Trp или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. Согласно другому альтернативному варианту пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP. RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид "доставки", который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, последовательности белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK), как было обнаружено, способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно, пептид или пептидомиметик, связанный со средством для РНК-интерференции, посредством введенной

мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Пептидный фрагмент может варьироваться по длине в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно применять для целенаправленного воздействия на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). RGD-пептид может облегчать нацеливание средства для РНК-интерференции на опухоли из целого ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно, RGD-пептид будет облегчать нацеливание средства для РНК-интерференции на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на специфические ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство для РНК-интерференции к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Можно использовать пептиды, которые нацеливаются на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие клетки. Например, RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут нацеливаться на раковые клетки, в частности, клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролиферации клеток и

ангиогенеза. Предпочтительными являются конъюгаты с таким типом лигандов, которые нацеливаются на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например, раковый ген, описанный в данном документе.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" позволяет проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефенсин, β -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 пептида слияния gp41 HIV-1 и NLS из большого T-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте).

Согласно одному варианту осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический α -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические α -спиральные пептиды включают, без ограничений, цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды S. slava, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плевроцидины, пептиды H₂A, пептиды Xenopus, эскулентины-1 и церины. Предпочтительно целый ряд факторов будет рассматриваться в связи с поддержанием целостности и стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэпирующий остаток (например, Gly,

представляет собой иллюстративный N-кэпирующий остаток), и/или будет использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной N-связи для стабилизации спирали. Стабильность может обеспечивать образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными $i \pm 3$ или $i \pm 4$ положениями. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспаратом.

Пептидные лиганды и лиганды-пептидомиметики включают лиганды, имеющие встречающиеся в природе или модифицированные пептиды, например, D- или L-пептиды; α -, β - или γ -пептиды; N-метил-пептиды; азапептиды; пептиды, у которых одна или несколько амидных, т. е. пептидных, связей замещена одной или несколькими мочевиными, тиомочевинными, карбаматными или сульфонилмочевинными связями; или циклические пептиды.

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер или аптамер. Кластер представляет собой комбинацию двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды рецептора-интегрин, лиганды хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCP11, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Основу лигандов также может составлять нуклеиновая кислота, например, в случае аптамера. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

Средства для высвобождения из эндосомы включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, поликатионы, скрытые олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэферы, полимеры со скрытыми или нескрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или нескрытыми катионными или анионными зарядами.

РК-модулятор означает модулятор фармакокинетических параметров. РК-модулятор включает липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотриоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотриоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов).

Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки (например, сывороточными белками) также пригодны в настоящем изобретении в качестве РК-модулирующих лигандов.

Другие конъюгаты, представляющие собой лиганды, пригодные в настоящем изобретении, описаны в заявках на патент США USSN: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833 934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

В тех случаях, когда присутствуют два или более лиганда, все лиганды могут обладать одинаковыми свойствами, могут обладать различными свойствами, или некоторые лиганды обладают одинаковыми свойствами, в то время как другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может обладать нацеливающими свойствами, обладать эндосомолитической активностью или обладать РК-модулирующими свойствами. Согласно предпочтительному варианту осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганды могут быть присоединены к олигонуклеотидам в разных местах, например, на 3'-конце, 5'-конце и/или во внутреннем

положении. Согласно предпочтительным вариантам осуществления лиганд присоединен к олигонуклеотидам через промежуточный связывающий фрагмент, например, носитель, описанный в данном документе. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на мономере, если указанный мономер вводится в растущую нить. Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть введен путем связывания с мономером-"предшественником" после того, как указанный мономер-"предшественник" был введен в растущую нить. К примеру, мономер, содержащий, например, связывающий фрагмент с аминогруппой на конце (т. е. без ассоциированного лиганда), например $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, может быть введен в растущую олигонуклеотидную нить. На следующей стадии, т. е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с электрофильной группой, например, группой сложного пентафторфенилэфира или альдегидной группой, затем можно прикрепить к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

Согласно другому примеру может быть введен мономер с химической группой, подходящей для участия в реакциях клик-химии, например, связывающий фрагмент/линкер с азидной или алкиновой группой на конце. На следующей стадии, т. е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с комплементарной химической группой, например алкиновой или азидной, может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания алкиновой и азидной группы вместе.

Что касается двухнитевых олигонуклеотидов, то лиганды могут быть присоединены к одной или обоим нитям. Согласно некоторым вариантам осуществления двухнитевое средство для РНК-интерференции содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью. Согласно другим вариантам осуществления двухнитевое средство для РНК-интерференции содержит лиганд, конъюгированный с антисмысловой нитью.

Согласно некоторым вариантам осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеиновыми основаниями, сахарными фрагментами или межнуклеозидными связями в молекулах нуклеиновых кислот.

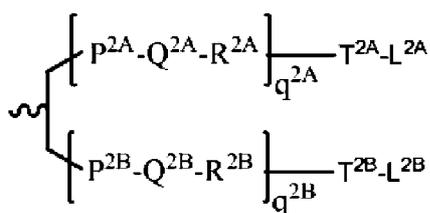
Конъюгация с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может происходить в любом положении, в том числе по атомам внутри кольца и вне кольца. Согласно некоторым вариантам осуществления к 2-, 6-, 7- или 8-положениям пуринового нуклеинового основания присоединен конъюгатный фрагмент. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть замещены конъюгатным фрагментом. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода в сахарном фрагменте, к которым может быть присоединен конъюгатный фрагмент, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. К положению 1' также может быть присоединен конъюгатный фрагмент, как, например, в остатке, с удаленным азотистым основанием. Межнуклеозидные связи также могут нести конъюгатные фрагменты. Что касается фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфорамидатной и т. п.), то конъюгатный фрагмент может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, PNA), конъюгатный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

Можно использовать любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд, хотя лиганд, как правило, представляет собой углевод, например, моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

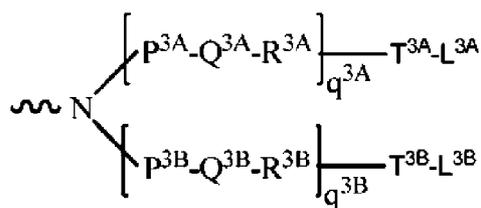
Линкеры, посредством которых лиганд конъюгируют с нуклеиновой кислотой, включают описываемые выше. Например, лиганд может представлять собой одно или несколько производных GalNAc (*N*-ацетилглюкозамина), присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту осуществления dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными

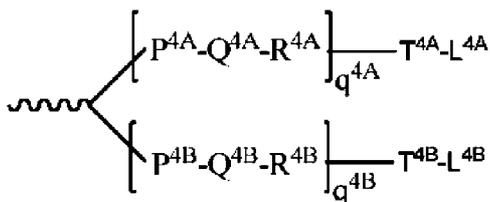
разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные в любой из формул (IV) - (VII):



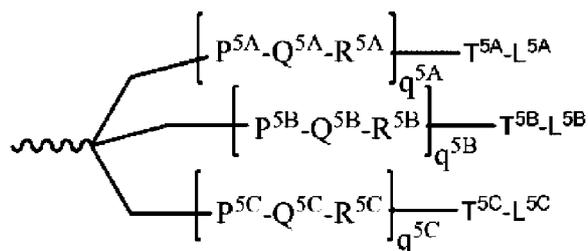
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)



Формула (VII)

или

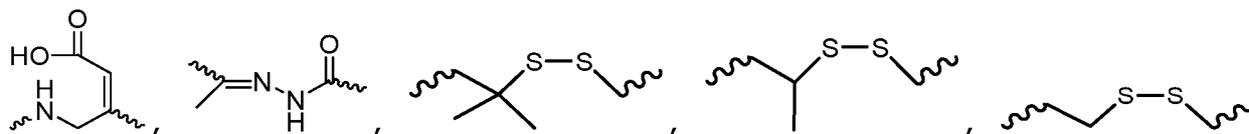
где

$q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ и $q^{5\text{C}}$ равняются независимо в каждом случае 0-20, и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из $R^{2\text{A}}$, $R^{2\text{B}}$, $R^{3\text{A}}$, $R^{3\text{B}}$, $R^{4\text{A}}$, $R^{4\text{B}}$, $R^{5\text{A}}$, $R^{5\text{B}}$, $R^{5\text{C}}$, $T^{2\text{A}}$, $T^{2\text{B}}$, $T^{3\text{A}}$, $T^{3\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{4\text{B}}$, $T^{5\text{A}}$, $T^{5\text{B}}$, $T^{5\text{C}}$ независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

$Q^{2\text{A}}$, $Q^{2\text{B}}$, $Q^{3\text{A}}$, $Q^{3\text{B}}$, $Q^{4\text{A}}$, $Q^{4\text{B}}$, $Q^{5\text{A}}$, $Q^{5\text{B}}$, $Q^{5\text{C}}$ независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где одна или несколько метиленовых групп могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый из $R^{2\text{A}}$, $R^{2\text{B}}$, $R^{3\text{A}}$, $R^{3\text{B}}$, $R^{4\text{A}}$, $R^{4\text{B}}$, $R^{5\text{A}}$, $R^{5\text{B}}$, $R^{5\text{C}}$ независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



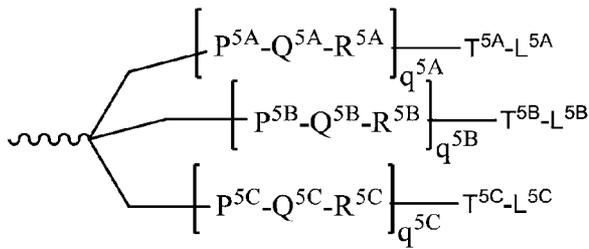
или гетероциклил;

$L^{2\text{A}}$, $L^{2\text{B}}$, $L^{3\text{A}}$, $L^{3\text{B}}$, $L^{4\text{A}}$, $L^{4\text{B}}$, $L^{5\text{A}}$, $L^{5\text{B}}$ и $L^{5\text{C}}$ представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо в каждом случае представляет

собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

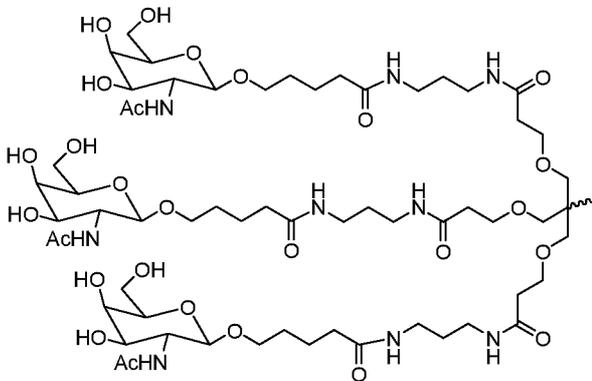
В случае средств для RNAi, служащих для ингибирования экспрессии целевого гена, особенно применимы трехвалентные линкеры, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, такие как линкеры формулы (VII):

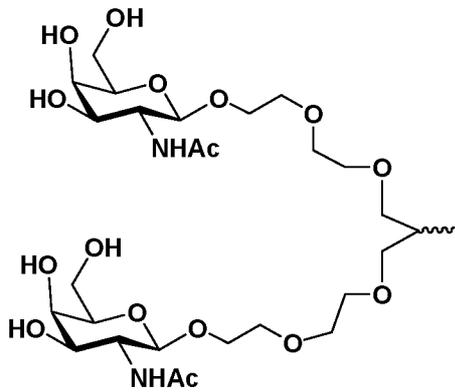
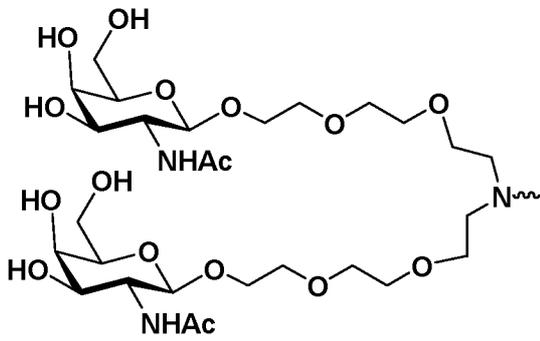
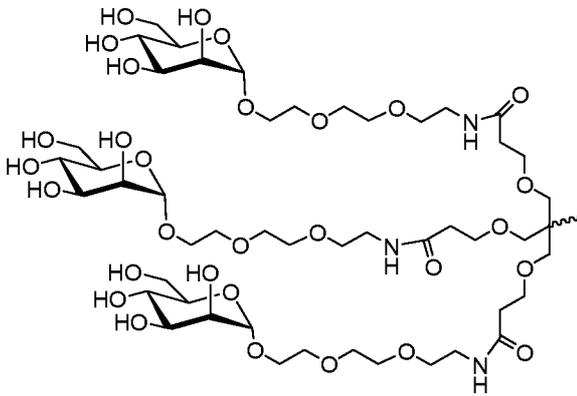
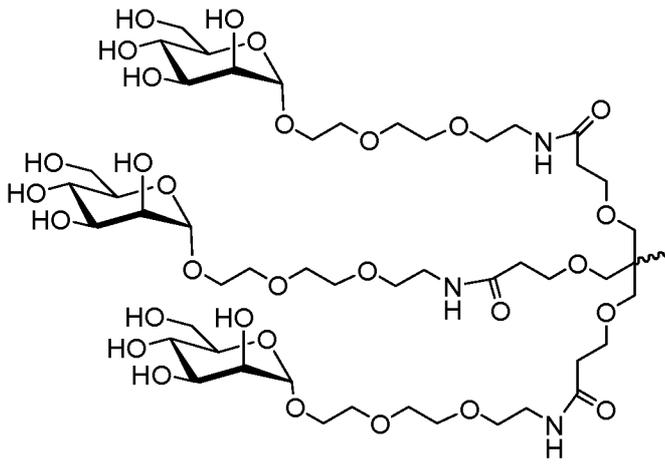


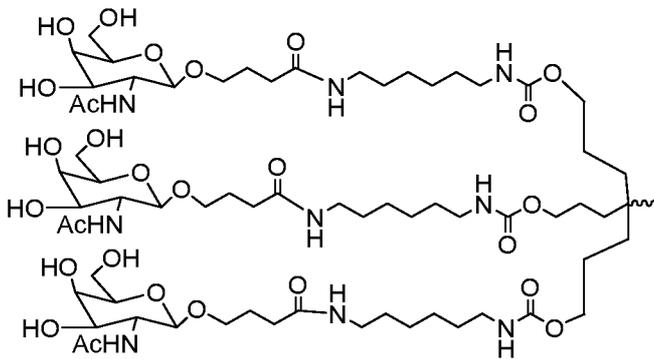
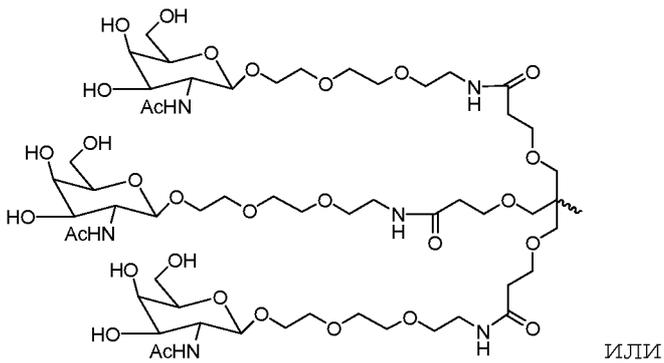
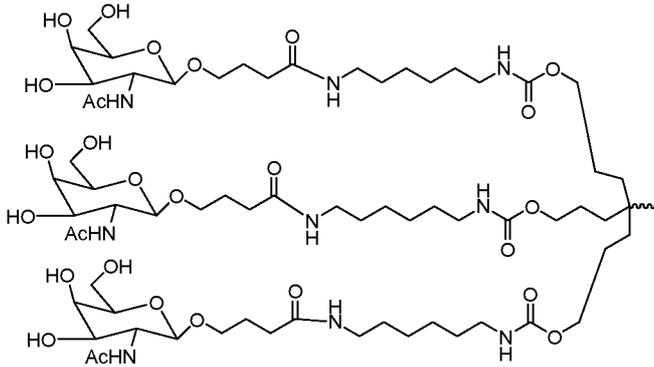
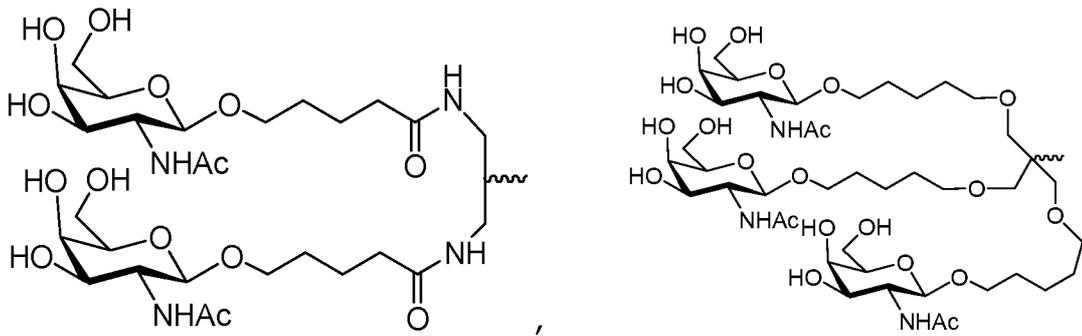
Формула (VII)

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, включают без ограничения следующие соединения:







Определения

Используемые в данном документе термины "dsRNA", "siRNA" и "средство для РНК-интерференции" используются взаимозаменяемо для обозначения средств, которые могут опосредовать сайленсинг

целевой РНК, *например*, мРНК, *например*, транскрипта гена, кодирующего белок. Для удобства такая мРНК в данном документе также называется как подлежащая сайленсингу мРНК. Такой ген также называется целевым геном. В общем смысле подлежащая сайленсингу РНК представляет собой эндогенный ген или ген патогена. Кроме того, РНК, отличные от мРНК, *например*, тРНК и вирусные РНК, также можно подвергать целенаправленному воздействию.

Используемое в данном документе выражение "опосредовать RNAi" относится к способности осуществлять сайленсинг целевой РНК посредством специфического к последовательности механизма. Не желая быть ограниченным какой-либо теорией, полагаются, что при сайленсинге используется система или процесс RNAi и направляющая РНК, *например*, средство, представляющее собой siRNA из 21-23 нуклеотидов.

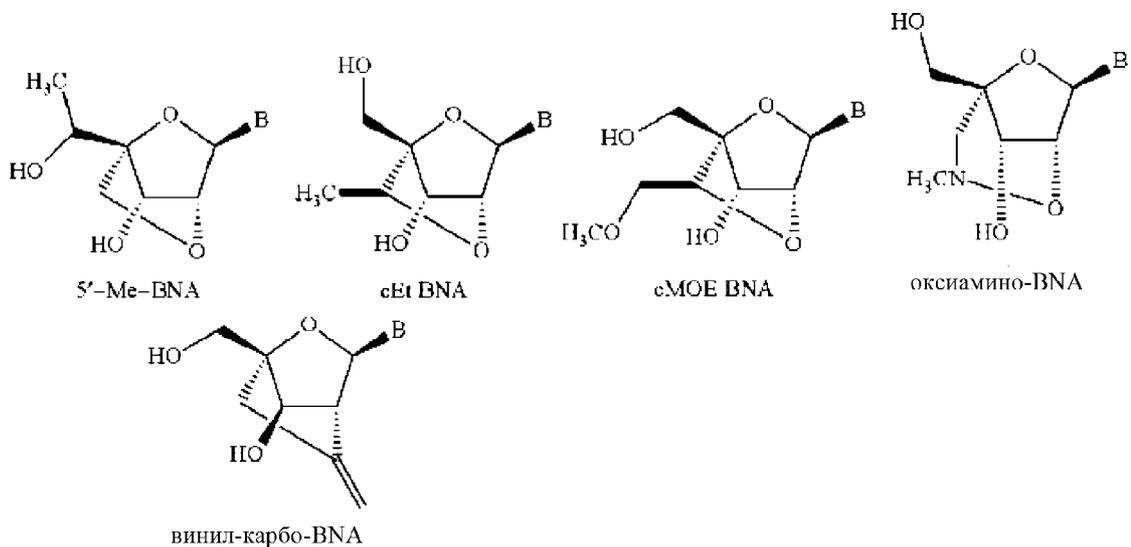
Используемые в данном документе "специфически гибридизуемый" и "комплементарный" представляют собой термины, которые используются для обозначения достаточной степени комплементарности, при которой между соединением по настоящему изобретению и молекулой целевой РНК происходит стабильное и специфическое связывание. Для специфического связывания требуется достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигомерного соединения с нецелевыми последовательностями в условиях, при которых надеются получить специфическое связывание, *т. е.* при физиологических условиях в случае анализов или терапевтического лечения или же, в случае *in vitro* анализов, в условиях, при которых проводят анализы. Как правило, нецелевые последовательности отличаются по меньшей мере 5 нуклеотидами.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению является "в достаточной степени комплементарным" с целевой РНК, *например*, целевой мРНК, так что средство, представляющее собой dsRNA, приводит к сайленсингу выработки белка, кодируемого целевой мРНК. Согласно другому варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению является

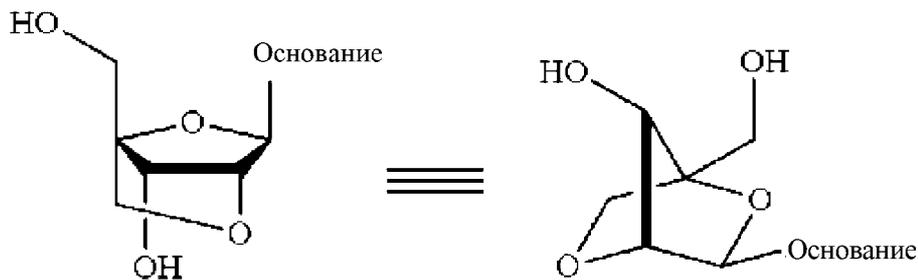
"полностью комплементарным" целевой РНК, *например*, целевая РНК и средство, представляющее собой dsRNA-дуплекс, гибридизуются, *например*, с образованием гибрида, полученного исключительно за счет спаривания оснований по Уотсону-Крику в участке полной комплементарности. "Достаточная степень комплементарности" с целевой РНК может распространяться на внутренний участок (*например*, по меньшей мере из 10 нуклеотидов), который полностью комплементарен с целевой РНК. Более того, согласно некоторым вариантам осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению специфично распознает различие в один нуклеотид. В данном случае средство, представляющее собой dsRNA, опосредует RNAi лишь тогда, когда полная комплементарность установлена в участке (*например*, в пределах 7 нуклеотидов) от различия в один нуклеотид.

Используемый в данном документе термин "олигонуклеотид" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), *например*, длина которой составляет менее 100, 200, 300 или 400 нуклеотидов.

Термин 'BNA' относится к мостиковой нуклеиновой кислоте, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК. BNA может содержать 5-, 6-членную или даже 7-членную мостиковую структуру с "фиксированным" C₃'-эндо выступом сахара. Как правило, мостик встраивают на 2'-, 4'-положении рибозы с получением нуклеотида 2', 4'-BNA (*например*, LNA или ENA). Примеры нуклеотидов BNA включают следующие нуклеозиды:



Термин 'LNA' относится к запертой нуклеиновой кислоте, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК. LNA представляет собой модифицированный нуклеотид РНК. Рибозный фрагмент в нуклеотиде LNA модифицируют с помощью дополнительного мостика (например, метиленового мостикам или этиленового мостика), соединяющего 2'-гидроксил с 4'-углеродом того же рибозного сахара. К примеру, мостик может "запирать" рибозу в конформации 3'-эндо (северная):



Термин 'ENA' относится к нуклеиновой кислоте с этиленовыми мостиками, и она зачастую называется затрудненной или недоступной РНК.

В данном документе "сайт расщепления" означает связь в остове целевого гена или смысловой нити, которая расщепляется с помощью системы RISC при использовании средства для РНК-интерференции. При этом целевой участок сайта расщепления содержит по меньшей мере один или по меньшей мере два нуклеотида на обеих сторонах сайта расщепления. В случае смысловой нити сайт расщепления представляет собой связь в остове смысловой нити, которая должна расщепляться, когда смысловая нить сама по себе стала мишенью, подлежащей расщеплению с помощью механизма RNAi. Сайт расщепления можно определять с использованием способов, известных из уровня техники, например, анализа 5'-RACE, подробно описанного в публикации Soutschek *et al.*, *Nature* (2004) 432, 173-178, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. Как хорошо известно из уровня техники, участок сайта расщепления для конического двухнитевого средства для RNAi, содержит две нити длиной 21 нуклеотид (где эти нити образуют двухнитевой участок из 19 последовательных пар оснований с однонитевыми выступающими концами из 2 нуклеотидов

на 3'-концах), при этом участок сайта расщепления соответствует положениям 9-12 от 5'-конца смысловой нити.

Термин "галоген" относится к любому радикалу на основе атома фтора, хлора, брома или йода. Термин "алкил" относится к насыщенным или ненасыщенным неароматическим углеводородным цепям, которые могут иметь прямую цепь или разветвленную цепь, содержащую обозначенное число атомов углерода (они включают без ограничений пропил, аллил или пропаргил), в которые необязательно могут быть встроены N, O или S. Например, C₁-C₁₀ означает, что данная группа может иметь в своем составе от 1 до 10 (включительно) атомов углерода. Термин "алкокси" относится к радикалу -O-алкил. Термин "алкилен" относится к двухвалентному алкилу (т. е. -R-). Термин "алкилендиоксо" относится к двухвалентной группе атомов со структурой -O-R-O-, в которой R представляет собой алкилен. Термин "аминоалкил" относится к алкилу, замещенному аминогруппой. Термин "меркапто" относится к радикалу -SH. Термин "тиоалкокси" относится к радикалу -S-алкил.

Термин "арил" относится к 6-углеродной моноциклической или 10-углеродной бициклической ароматической кольцевой системе, где 0, 1, 2, 3 или 4 атома в каждом кольце могут быть замещены заместителем. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил и т. п. Термин "арилалкил" или термин "аралкил" относится к алкилу, замещенному арилом. Термин "арилалкокси" относится к алкокси, замещенному арилом.

Термин "циклоалкил", используемый в данном документе, включает насыщенные и частично ненасыщенные циклические углеводородные группы с 3-12 атомами углерода, например, 3-8 атомами углерода, и, например, 3-6 атомами углерода, где циклоалкильная группа дополнительно может быть необязательно замещенной. Циклоалкильные группы включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил.

Термин "гетероарил" относится к ароматической 5-8-членной моноциклической, 8-12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической кольцевой системе с 1-3 гетероатомами в случае моноциклической системы, 1-6 гетероатомами в случае

бициклической системы или 1-9 гетероатомами в случае трициклической системы, при этом указанные гетероатомы выбраны из O, N или S (например, система содержит атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов из числа N, O или S в случае моноциклической, бициклической или трициклической системы соответственно), где 0, 1, 2, 3 или 4 атома в каждом кольце могут быть замещены заместителем. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, фурил или фуранил, имидазолил, бензимидазолил, пиримидинил, тиофенил или тиенил, хинолинил, индолил, тиазолил и т. п. Термин "гетероарилалкил" или термин "гетероаралкил" относится к алкилу, замещенному гетероарилом. Термин "гетероарилалкокси" относится к алкокси, замещенному гетероарилом.

Термин "гетероциклил" относится к неароматической 5-8-членной моноциклической, 8-12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической кольцевой системе с 1-3 гетероатомами в случае моноциклической системы, 1-6 гетероатомами в случае бициклической системы или 1-9 гетероатомами в случае трициклической системы, при этом указанные гетероатомы выбраны из O, N или S (например, система содержит атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов из числа N, O или S в случае моноциклической, бициклической или трициклической системы соответственно), где 0, 1, 2 или 3 атома в каждом кольце могут быть замещены заместителем. Примеры гетероциклильных групп включают тризолил, тетразолил, пиперазинил, пирролидинил, диоксанил, морфолинил, тетрагидрофуранил и т. п.

Термин "оксо" относится к атому кислорода, который образует карбонил при связывании с углеродом, N-оксид при связывании с азотом и сульфоксид или сульфон при связывании с серой.

Термин "ацил" относится к алкилкарбонильному, циклоалкилкарбонильному, арилкарбонильному, гетероциклилкарбонильному или гетероарилкарбонильному заместителю, любой из которых может быть дополнительной замещен заместителями.

Термин "замещенный" относится к замене одного или нескольких водородных радикалов в указанной структуре радикалом указанного

заместителя, включающего без ограничения: галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, тиол, алкилтио, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, амина, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминамино, гидроксид, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоновую кислоту, сульфоновую кислоту, сульфонил, фосфоновую кислоту, арил, гетероарил, гетероциклический и алифатический радикал. Понятно, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Расщепляемые линкерные группы

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая при попадании в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. Согласно предпочтительному варианту осуществления средства, представляющего собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением расщепляемая линкерная группа расщепляется приблизительно в 10 раз или более, предпочтительно по меньшей мере 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, свойственных крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к средствам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или встречаются на более высоких уровнях или обладают большей активностью внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для конкретных субстратов или которые не

обладают специфичностью к субстрату, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую с помощью редокс-потенциала линкерную группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие средства, которые приводят к значению pH, равному пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве универсальной кислоты, пептидаз (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатаз.

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

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, на которую производится нацеливание. Например, лиганды, нацеливающий на печень, можно связать с катионными липидами через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, которые не характеризуются высоким содержанием эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

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

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы может быть оценена с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью. Таким образом можно определить чувствительность к расщеплению, соответствующую первым и вторым условиям, при этом первые условия выбирают так, чтобы они характеризовали расщепление в целевой клетке, а вторые условия выбирают так, чтобы они характеризовали расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно выполнить первоначальные измерения в условиях бесклеточной системы или в условиях культуры и подтвердить путем дальнейших измерений на животных в целом. Согласно предпочтительным вариантам осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

Расщепляемые с помощью редокс-потенциала линкерные группы

Одним классом расщепляемых линкерных групп являются расщепляемые с помощью редокс-потенциала линкерные группы, которые можно использовать в средстве, представляющем собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением, эти группы расщепляются при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или,

например, подходящей для применения с конкретным фрагментом для РНК-интерференции и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидата можно оценить при инкубировании с дитиотрептолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, в целевой клетке. Кандидаты также могут быть оценены в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке. Согласно предпочтительному варианту осуществления самое большее 10% кандидатных соединений расщепляются в крови. Согласно предпочтительным вариантам осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 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). Степень расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Фосфатные расщепляемые линкерные группы

Фосфатные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в средстве, представляющем собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением, расщепляются под действием средств, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы клетки. Примерами фосфатных линкерных групп являются O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительные варианты осуществления представляют собой -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный

вариант осуществления представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые кислотой линкерные группы

Расщепляемые кислотой линкерные группы, которые можно использовать в средстве, представляющем собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением представляют собой линкерные группы, которые расщепляются в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде при значении pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже) или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке определенные органеллы с низким значением 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 атом углерода, присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Сложноэфирные линкерные группы

Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в средстве, представляющем собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением расщепляются под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы клетки. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше.

Пептидные расщепляемые группы

Пептидные расщепляемые линкерные группы, которые можно использовать в средстве, представляющем собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением расщепляются под действием ферментов, таких как пептидазы и протеазы клетки. 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 быть образована 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, ограничивается пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу полностью. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $\text{-NHCHR}^{\text{A}}\text{C(O)NHCHR}^{\text{B}}\text{C(O)-}$, где R^{A} и R^{B} представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены при помощи способов, аналогичных описанным выше. Используемый в данном документе термин "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 образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или к 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 образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4-9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие

как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные моносахариды включают C₅ и выше (предпочтительно C₅-C₈) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными звеньями (предпочтительно C₅-C₈).

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, определяемого в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена. Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, для подавления экспрессии целевого гена *in vitro*.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, определяемого в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена у субъекта. Субъект может представлять собой любое животное, такое как млекопитающее, например, мышь, крысу, овцу, крупный рогатый скот, собаку, кошку или человека.

Согласно одному варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению вводят в буфере.

Согласно одному варианту осуществления описанные в данном документе соединения, представляющие собой siRNA, можно составлять для введения субъекту. Составленная композиция, содержащая siRNA, может допускать пребывание в различных состояниях. Согласно некоторым примерам данная композиция является по меньшей мере частично кристаллической, однородно кристаллической и/или безводной (например, содержит менее 80, 50, 30, 20 или 10% воды). Согласно другому примеру siRNA находится в водной фазе, например, в растворе, который включает воду.

Водную фазу или кристаллические композиции, например, можно ввести в средство доставки, например, в липосому (в частности, в случае водной фазы) или в частицу (например, микрочастицу, которая может быть подходящей для кристаллической композиции). В целом композицию на основе siRNA составляют таким способом, который совместим с предполагаемым способом введения, описанным в данном документе. Например, согласно конкретным вариантам

осуществления композицию получают при помощи по меньшей мере одного из следующих способов: высушивание распылением, лиофилизация, вакуумная сушка, выпаривание, высушивание в псевдооживленном слое или комбинация данных методик; или ультразвуковая обработка с липидами, сушка вымораживанием, конденсация и другие способы самосборки.

Препарат на основе siRNA может быть составлен в комбинации с другим средством, *например*, с другим терапевтическим средством или средством, которое стабилизирует siRNA, *например*, белком, который образует комплекс с siRNA с образованием iRNP. Еще одни средства включают хелаторы, *например*, EDTA (*например*, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКазы (*например*, ингибиторы РНКазы с широким спектром специфичности, такие как RNasin®) и так далее.

Согласно одному варианту осуществления препарат на основе siRNA включает другое соединение, представляющее собой siRNA, *например*, вторую siRNA, которая может опосредовать RNAi в отношении второго гена или в отношении того же гена. Еще один препарат может включать по меньшей мере 3, 5, десять, двадцать, пятьдесят или сто или более разных видов siRNA. Такие siRNA могут опосредовать RNAi в отношении аналогичного числа разных генов.

Согласно одному варианту осуществления препарат на основе siRNA включает по меньшей мере второе терапевтическое средство (*например*, средство, не являющееся РНК или ДНК). *Например*, композиция на основе siRNA для лечения вирусного заболевания, *например*, ВИЧ, может включать известное противовирусное средство (*например*, ингибитор протеазы или ингибитор обратной транскриптазы). Согласно другому примеру композиция на основе siRNA для лечения рака может дополнительно содержать химиотерапевтическое средство.

Ниже обсуждаются иллюстративные составы, которые можно использовать для введения средства, представляющего собой dsRNA, в соответствии с настоящим изобретением.

Липосомы Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении

соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что данные составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, модифицированными siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Препарат на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения, представляющего собой ssiRNA, (например, на основе предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой siRNA, например, соединение, представляющее собой двухнитевую siRNA, или соединение, представляющего собой ssiRNA, или их предшественник) может быть составлен для доставки в мембранно-молекулярном комплексе, например, в липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе siRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе siRNA, 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, в случае нанесения липосом на ткань бислоем липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того, как происходит слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое содержит siRNA, доставляется в клетку, где siRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления siRNA в конкретные типы клеток.

Липосому, содержащую средство, представляющее собой siRNA, можно получать с помощью ряда способов. Согласно одному примеру липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для образования мицелл из липидного компонента. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат на основе средства, представляющего собой siRNA, затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют с siRNA и конденсируются вокруг siRNA с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, путем диализа, с получением липосомного препарата на основе siRNA.

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

Дополнительное описание способов получения стабильных средств доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов средства доставки, описаны, например, в документе WO 96/37194. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в публикации Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; публикациях 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, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов с размером, подходящим для

использования в качестве средств доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, публикацию Mayer, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Микрофлюидизацию можно использовать в тех случаях, когда требуются стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Данные способы легко адаптировать для упаковки препаратов на основе siRNA в липосомы.

Липосомы, которые являются рН-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают молекулы нуклеиновых кислот вместо образования комплекса с ними. Поскольку как молекулы нуклеиновых кислот, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее некоторые молекулы нуклеиновых кислот оказываются захваченными внутри водного внутреннего пространства этих липосом. рН-чувствительные липосомы использовались для доставки ДНК, кодирующей ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена выявляли в целевых клетках (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 19, (1992) 269-274, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте).

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

Примеры других способов для введения липосом в клетки *in vitro* включены в патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO

94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *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.

Согласно одному варианту осуществления используют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом состоит в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны сливаться настолько же эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и их можно использовать для доставки siRNA в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; в липосомы можно включать множество водо- и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать siRNA, инкапсулированные в их внутренние компартменты, от метаболического превращения и разрушения (Rosoff в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно использовать 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 siRNA (см., например., Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 для описания DOTMA и его использования с ДНК, которые включены посредством ссылки по всей своей полноте).

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(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают такие соединения, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермил-амид ("DPPE5") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помощью холестерина ("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). Сообщалось, что липополизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., Biochim. Biophys. Acta 1065:8, 1991, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и

обеспечивают более эффективную трансфекцию, 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 особенно подходят для местного применения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие, связанное с интенсивной системной абсорбцией введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в требуемой мишени и возможность введения siRNA в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы применяют для доставки siRNA в клетки эпидермиса, а также для улучшения проникновения siRNA в ткани дермы, например, в кожу. Например, липосомы можно наносить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner *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, который включены посредством ссылки во всей своей полноте).

Также исследовались неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное 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), использовали для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы с siRNA применимы для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают siRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, типом деформируемых липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомную композицию. Трансферсомы, которые включают siRNA, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки siRNA 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 трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и, зачастую, могут достигать своих мишеней без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

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

Поверхностно-активные вещества Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что данные составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой модифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (включая микроэмульсии) и липосомы

(см. выше). Композиции на основе siRNA (или предшественника, например, более крупных dsRNA, которые могут процессироваться в siRNA, или ДНК, которые кодируют siRNA или предшественник) могут включать поверхностно-активное вещество. Согласно одному варианту осуществления siRNA составляют в виде эмульсии, которая включает поверхностно-активное вещество. 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 обеспечивает наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в составах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).

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

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное.

Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламидаминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее 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, NY, 1988, p. 285).

Мицеллы и другие мембранные составы Для простоты изложения мицеллы и другие составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой немодифицированную siRNA. Однако следует понимать, что мицеллы и другие составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой модифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Композиция на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения,

представляющего собой *ssiRNA*, (например, на основе предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную *siRNA*, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой *ssiRNA*, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой *siRNA*, например, соединение, представляющее собой двухнитевую *siRNA*, или соединение, представляющее собой *ssiRNA*, или их предшественник) может быть представлена в виде мицеллярного состава. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе *siRNA*, C_8 - C_{22} алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, 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 одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут формироваться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

Согласно одному способу 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. Согласно другому способу мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

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

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметиловый 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 требуется увеличить, например, по меньшей мере удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

Частицы Для простоты изложения частицы, составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений, представляющих собой модифицированную siRNA. Однако следует понимать, что эти частицы и другие составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями, представляющими собой siRNA, например, соединениями, представляющими собой немодифицированные siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Согласно другому варианту осуществления препараты на основе соединения, представляющего собой siRNA, например, соединения, представляющего собой двухнитевую siRNA, или соединения, представляющего собой ssiRNA, (например, на основе предшественника, например, соединения, представляющего собой более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение, представляющее собой ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение, представляющее собой siRNA, например, соединение, представляющее собой двухнитевую siRNA, или соединение, представляющее собой ssiRNA, или их предшественник) могут быть введены в частицу, например, в микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

Фармацевтические композиции

Средства для РНК-интерференции по настоящему изобретению могут быть составлены для применения в фармации. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей определенное в данном документе средство, представляющее собой dsRNA. Фармацевтически приемлемые композиции содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких из средств, представляющих собой dsRNA, согласно любому из предшествующих вариантов осуществления, взятых отдельно или составленные вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками), наполнителями и/или разбавителями.

В частности, фармацевтические композиции могут быть

составлены для введения в твердой или жидкой форме, включая композиции, которые адаптированы для следующего: (1) перорального введения, например, жидкие лекарственные формы (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, таблетки, предназначенные для трансбуккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентерального введения, например, посредством подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции, как, например, стерильный раствор или суспензия, или состав с замедленным высвобождением; (3) местного нанесения, например, в виде наносимых на кожу крема, мази или пластыря или распыляемого раствора с контролируемым высвобождением; (4) интравагинального или внутрипрямокишечного введения, например, в виде пессария, крема или пены; (5) подъязычного введения; (6) глазного введения; (7) трансдермального или (8) интраназального введения. Особенно предпочтительной может быть доставка с использованием подкожных или внутривенных способов введения.

Используемая в данном документе фраза "терапевтически эффективное количество" означает, такое количество соединения, материала или композиции, содержащих соединение по настоящему изобретению, которое является эффективным для создания некоторого требуемого терапевтического эффекта по меньшей мере у субпопуляции клеток в животном при приемлемом соотношении польза/риск, применимом для любого терапевтического лечения.

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 человека и животных без чрезмерных токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, вспомогательное

вещество при производстве (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 пациенту. 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) апиrogenную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (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.

С целью удобства составы могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области фармации. Количество активного ингредиента, который можно объединять с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, будет

варьироваться в зависимости от реципиента, подлежащего лечению, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединять с материалом носителя для получения единичной лекарственной формы, обычно будет представлять собой количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из расчета сто процентов данное количество будет варьироваться от приблизительно 0,1 процента до приблизительно девяноста девяти процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 5 процентов до приблизительно 70 процентов, наиболее предпочтительно от приблизительно 10 процентов до приблизительно 30 процентов.

Согласно определенным вариантам осуществления состав по настоящему изобретению содержит наполнитель, выбранный из группы, состоящей из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих средств, например, желчных кислот, и полимерных носителей, например, сложных полиэфиров и полиангидридов; и соединение по настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления вышеуказанный состав придает биологическую доступность при пероральном введении соединению по настоящему изобретению.

Препарат на основе средств для РНК-интерференции может быть составлен в комбинации с другим средством, например, другим терапевтическим средством или средством, которое придает стабильность средству для РНК-интерференции, например, белок, который в совокупности со средством для РНК-интерференции образует iRNP. Еще одни средства включают хелаторы, например, EDTA (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКазы (например, ингибиторы РНКазы с широким спектром специфичности, такие как RNasin®) и так далее.

Способы получения этих составов или композиций включают стадию объединения соединения по настоящему изобретению с носителем и, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения по настоящему изобретению с жидкими носителями, или тонкоизмельченными твердыми носителями, или обоими, а затем, при

необходимости, придания продукту формы.

В ряде случаев для пролонгирования эффекта лекарственного средства требуется замедлить всасывания лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Этого можно достичь путем использования жидкой суспензии на основе кристаллического или аморфного материала, имеющего слабую растворимость в воде. К тому же скорость всасывания лекарственного средства зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и от кристаллической формы. В качестве альтернативы замедленного всасывания парентерально вводимой формы лекарственного средства достигают путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном носителе.

Соединения по настоящему изобретению можно составлять для введения любым общепринятым способом для применения в медицине или в ветеринарной медицине аналогично другим фармацевтическим препаратам.

Подразумевается, что термин "лечение" охватывает также профилактику, терапию и излечение. Пациент, получающий данный вид лечения, представляет собой любое животное, требующее этого, включая приматов, в частности, людей, а также других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свинья и овца; а также домашняя птица и домашние питомцы в общем смысле.

Двухнитевые средства для RNAi образуются в клетке *in vivo*, например, на основании экзогенных ДНК-матриц, которые доставляют в клетку. Например, ДНК-матрицы можно встраивать в векторы и использовать в качестве векторов для генной терапии. Векторы для генной терапии можно доставлять субъекту, например, путем внутривенной инъекции, местного введения (патент США № 5328470, который включен посредством ссылки во всей своей полноте) или стереотаксической инъекции (см., например, Chen *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте). Фармацевтический препарат на основе вектора для генной терапии может включать вектор для генной терапии в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу для замедленного высвобождения, в которую

заклучено средство доставки генов. ДНК-матрицы могут включать, например, две транскрипционные единицы, на одной из которых образуется транскрипт, который включает в себя верхнюю нить средства, представляющего собой dsRNA, а на другой образуется транскрипт, который включает в себя нижнюю нить средства, представляющего собой dsRNA. Когда матрицы транскрибированы, происходит образование средства, представляющего собой dsRNA, и оно процессируется на фрагменты средства, представляющего собой siRNA, которые опосредуют сайленсинг генов.

Пути доставки

Средство, представляющее собой dsRNA, как определено в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, как определено в данном документе, можно вводить субъекту с использованием разных путей доставки. Композиция, включающая средство для РНК-интерференции, может быть доставлена субъекту с помощью разных путей. Иллюстративные пути включают: внутривенный, подкожный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, интраназальный, легочной, глазной.

Молекулы для РНК-интерференции и/или средство, представляющее собой dsRNA, по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Как правило, такие композиции включают один или несколько видов средств для РНК-интерференции и фармацевтически приемлемый носитель. Используемая в данном документе формулировка "фармацевтически приемлемый носитель" предназначена для включения любых растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, средств для придания изотоничности и средств, задерживающих всасывание, и т.п., совместимых с применением в фармацевтических препаратах. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением тех случаев, когда какая-либо стандартная среда или средство не совместимы с активным соединением, предполагается их использование в композициях. В композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли местное или системное лечение, и от участка, подлежащего обработке. Введение может быть местным (в том числе офтальмическим, вагинальным, ректальным, интраназальным, трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное введение, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию, или интратекальное или интравентрикулярное введение.

Путь и место введения можно выбрать для увеличения целенаправленного воздействия. Например, для целенаправленного воздействия на мышечные клетки логическим выбором будет внутримышечная инъекция в мышцы, представляющие интерес. Целенаправленно воздействовать на клетки легких можно путем введения средства для РНК-интерференции в форме аэрозоля. Целенаправленно воздействовать на клетки эндотелия сосудов можно путем нанесения средства для РНК-интерференции на баллонный катетер и механического введения ДНК.

Дозировка

Согласно одному аспекту в настоящем изобретении представлен способ введения средства, представляющего собой dsRNA, например, средства, представляющего собой siRNA, субъекту (например, человеку-субъекту). Согласно другому аспекту настоящее изобретение дополнительно относится к средства, представляющего собой dsRNA, как определено в данном документе, для применения в подавлении экспрессии целевого гена у субъекта. Способ или применение для медицинских целей включает введение разовой дозы средства, представляющего собой dsRNA, например, средства, представляющего собой siRNA, например, средства, представляющее собой двухнитевую siRNA, при этом (a) длина двухнитевой части которого составляет 14-40 нуклеотидов (нт), например, 21-23 нт, (b) которое комплементарно целевой РНК (например, эндогенной или целевой РНК патогена), и необязательно (c) которое включает по меньшей мере один 3'-выступающий конец длиной в 1-5 нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления разовая доза составляет менее 10 мг на кг массы тела или менее 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1,

0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 или 0,00001 мг на кг массы тела, и менее 200 нмоль средства, представляющего собой РНК (например, приблизительно $4,4 \times 10^{16}$ копий), на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 нмоль средства, представляющего собой РНК, на кг массы тела.

Заданное количество может представлять собой количество, которое эффективно для лечения или предупреждения заболевания или нарушения, например, заболевания или нарушения, ассоциированных с целевой РНК. Например, разовую дозу можно вводить путем инъекции (например, внутривенной, подкожной или внутримышечной), в виде вдыхаемой дозы или местного нанесения. Согласно некоторым вариантам осуществления дозы могут составлять менее 10, 5, 2, 1 или 0,1 мг/кг массы тела.

Согласно некоторым вариантам осуществления разовую дозу вводят с частотой менее одного раза в день, например, менее одного раза каждые 2, 4, 8 или 30 дней. Согласно другому варианту осуществления разовую дозу не вводят с определенной частотой (например, с нерегулярной частотой). Например, разовую дозу можно вводить однократно.

Согласно одному варианту осуществления эффективную дозу вводят наряду с другими традиционными терапевтическими воздействиями. Согласно одному варианту осуществления у субъекта имеется вирусная инфекция, при этом воздействие представляет собой применение противовирусного средства, отличающегося от средства, представляющего собой dsRNA, например, отличающегося от средства, представляющего собой siRNA. Согласно другому варианту осуществления у субъекта имеется атеросклероз, при этом эффективную дозу средства, представляющего собой dsRNA, например, средства, представляющего собой siRNA, вводят в комбинации, например, после хирургического вмешательства, например, ангиопластики.

Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз средства, представляющего собой dsRNA, например, средства, представляющего собой siRNA (например, предшественника, например средства,

представляющего собой более крупную dsRNA, которое может быть процессировано в средство, представляющее собой siRNA, или ДНК, которая кодирует средство, представляющее собой dsRNA, *например, средство, представляющее собой siRNA, или его предшественника*). Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или более низкими, чем начальная доза, *например, вполовину меньше исходной дозы*. Поддерживающий режим может включать лечение субъекта с помощью дозы или доз в диапазоне от 0,01 мкг до 15 мг/кг массы тела в день, *например, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,00001 мг на кг массы тела в день*. Например, поддерживающие дозы вводят не более одного раза каждые 2, 5, 10 или 30 дней. Кроме того, режим лечения может продолжаться в течение периода времени, который будет варьироваться в зависимости от природы конкретного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. Согласно определенным вариантам осуществления дозу можно доставлять не более одного раза в день, *например, не более одного раза в 24, 36, 48 или более часов, например, не более одного раза каждые 5 или 8 дней*. После лечения пациента подвергают мониторингу в отношении изменений в его состоянии и в отношении облегчения симптомов болезненного состояния. Дозу соединения можно увеличить в случае, если пациент в достаточной степени реагирует на текущие уровни доз, или же дозу можно снизить, если наблюдают облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние было ослаблено, или в случае наблюдения нежелательных побочных действий.

Эффективную дозу можно вводить в виде однократной дозы или в виде двух или более доз, при необходимости или если это считается целесообразным в определенных обстоятельствах. Если требуется облегчить проведение повторных или частых инфузий может быть целесообразной имплантация устройства для доставки, *например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интрацистернального или внутрисуставного) или резервуара*.

Согласно одному варианту осуществления композиция включает множество видов средств, представляющих собой dsRNA. Согласно другому варианту осуществления вид средства, представляющего

собой dsRNA, имеет последовательности, которые не перекрываются и не смежны с последовательностями другого вида, с учетом встречающейся в природе целевой последовательности. Согласно другому варианту осуществления множество видов средств, представляющих собой dsRNA, является специфичным для различных встречающихся в природе целевых генов. Согласно другому варианту осуществления средство, представляющее собой dsRNA, является аллель-специфичным.

Описанные в данном документе средства, представляющие собой dsRNA, по настоящему изобретению можно вводить млекопитающим, в частности, крупным млекопитающим, таким как приматы, на относящиеся к человеку, или люди, посредством множества путей.

Согласно одному варианту осуществления композицию на основе средства, представляющего собой dsRNA, *например*, средства, представляющего собой siRNA, вводят с помощью парентерального, *например*, внутривенного (*например*, в виде болюсной или диффундирующей инфузии), внутрикожного, внутрибрюшинного, внутримышечного, интратекального, интравентрикулярного, интракраниального, подкожного, чресслизистого, трансбуккального, сублингвального, эндоскопического, ректального, перорального, вагинального, местного, легочного, интраназального, уретрального или глазного путей. Введение может осуществляться субъектом или другим лицом, *например*, медицинским работником. Лекарственный препарат может обеспечиваться в виде отмеренных доз или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные режимы доставки более подробно обсуждаются ниже.

В настоящем изобретении предложены способы, композиции и наборы для ректального введения или доставки описанных в данном документе средств, представляющих собой dsRNA.

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к средствам, представляющим собой dsRNA, по настоящему изобретению для применения в описанных выше способах.

Способы подавления экспрессии целевого гена

Варианты осуществления по настоящему изобретению также относятся к способам подавления экспрессии целевого гена. Способ

предусматривает стадию введения средств, представляющих собой dsRNA, по любому из предыдущих вариантов осуществления в количестве, достаточном для подавления экспрессии целевого гена. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, как определено в данном документе, для подавления экспрессии целевого гена в целевой клетке. Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к применению средства, представляющего собой dsRNA, для подавления экспрессии целевого гена в целевой клетке *in vitro*.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу модуляции экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающему доставку в указанную клетку средства, представляющего собой dsRNA, по настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления целевой ген выбран из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, гена PDGF-бета, гена Erb-B, гена Src, гена CRK, гена GRB2, гена RAS, гена MEKK, гена JNK, гена RAF, гена Erk1/2, гена PCNA(p21), гена MYB, гена JUN, гена FOS, гена BCL-2, гепцидина, активированного белка C, гена циклина D, гена VEGF, гена EGFR, гена циклина A, гена циклина E, гена WNT-1, гена бета-катенина, гена с-MET, гена PKC, гена NFkB, гена STAT3, гена сурвивина, гена Her2/Neu, гена топоизомеразы I, гена топоизомеразы II альфа, мутаций в гене p73, мутаций в гене p21(WAF1/CIP1), мутаций в гене p27(KIP1), мутаций в гене PPM1D, мутаций в гене RAS, мутаций в гене кавеолина I, мутаций в гене MIB I, мутаций в гене MTA1, мутаций в гене M68, мутаций в генах-супрессорах опухоли и мутаций в гене-супрессоре опухоли p53.

Согласно конкретным вариантам осуществления настоящее изобретение относится к средствам, представляющим собой dsRNA, по настоящему изобретению для применения в описанных выше способах.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как дополнительно ограничивающие. Содержание всех ссылок, заявок на патент, находящихся на рассмотрении, и опубликованных патентов,

цитируемых на протяжении данной заявке, тем самым явным образом включено посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Скрининг siRNA-дуплексов *in vitro*

Культура клеток и трансфекции

Клетки Нер3В человека или клетки H.II.4.E крысы (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в RPMI (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), до отделения от культуральной чашки путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл siRNA-дуплексов на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. 80 мкл полной питательной среды без антибиотика, содержащей ~2 x10⁴ клеток Нер3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение либо 24 часов, либо 120 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с использованием однократной дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты для определения эффекта дозы выполняли с использованием 8 последовательных 4-кратных серийных разведений, при этом максимальная доза конечной концентрации дуплекса составляла 10 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen, № по кат. 610-12):

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 минут при 850 об./мин. с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на всем протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 минуты. Магнитные гранулы удерживали при помощи магнитной установки и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и перемешивали в течение 5 минут. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2

раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 минуты. Гранулы вновь удерживали и супернатант удаляли. Затем гранулы промывали 150 мкл промывочного буфера В, удерживали и супернатант удаляли. На следующей стадии гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, удерживали и супернатант удаляли. Гранулы оставляли высыхать в течение 2 минут. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и перемешивали в течение 5 минут при 70°C. Гранулы удерживали с помощью магнита в течение 5 минут. Удаляли 40 мкл супернатанта и вносили в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

Мастер-микс из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 1,6 мкл H₂O на реакцию добавляли к 5 мкл общей РНК. кДНК получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин., 37°C 120 мин., 85°C 5 с, хранение при 4°C.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E (человек), № по кат. 4308313 (грызун)), 0,5 мкл зонда TaqMan для TTR (Applied Biosystems № по кат. HS00174914_m1 (человек), № по кат. Rn00562124_m1 (крыса)) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени осуществляли в устройстве для ПЦР в режиме реального времени Roche LC480 (Roche). Каждый дуплекс исследовали по меньшей мере по двум независимым трансфекциям и каждую трансфекцию оценивали в двух повторностях, если не указано иное.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta Ct$ и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками,

трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955, или ложно-трансфицированными клетками. IC₅₀ рассчитывали с помощью модели подбора по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно клеток, трансфицированных AD-1955, или наивных клеток при таком же диапазоне доз, или относительно собственной наиболее низкой дозы. Значения IC₅₀ рассчитывали для каждой отдельной трансфекции, а также для комбинации, при этом отдельное значение IC₅₀ согласовывали с данными обеих трансфекций.

Результаты сайленсинга гена под действием иллюстративного siRNA-дуплекса с различными модификациями мотивов по настоящему изобретению показаны в таблице ниже.

Пример 2. Синтез РНК и гибридизация дуплексов

1. Синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды синтезировали на установке для синтеза АКТАoligopilot или на установке для синтеза ABI 394. Если не указано иное, для синтеза олигонуклеотидов использовали коммерчески доступную твердую подложку из стекла с контролируемым размером пор (dT-CPG, 500Å, Prime Synthesis) и РНК-фосфорамидиты со стандартными защитными группами, 5'-O-диметокситритил-N6-бензоил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-аденозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-цитидин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-O-диметил окситритил-N2-изобутирил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-гуанозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит и 5'-O-диметокситритил-2'-*трет*-бутилдиметилсилил-уридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит (Pierce Nucleic Acids Technologies). 2'-F-фосфорамидиты, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-фтор-цитидин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит и 5'-O-диметокситритил-2'-фторуридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтил-фосфорамидит приобретали у Promega. Все фосфорамидиты использовали в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (CH₃CN), за исключением гуанозина, который использовали в концентрации 0,2 М в 10% THF/ANC (объем/объем). Время связывания/повторения цикла составляло 16 минут. Активатор

представляет собой 5-этилтиотетразол (0,75 М, American International Chemicals); для PO-окисления использовали йод/воду/пиридин, а для PS-окисления использовали PADS (2%) в смеси 2,6-лутидин/ACN (1:1 объем/объем).

Лиганд-конъюгированные нити синтезировали с использованием твердой подложки, содержащей соответствующий лиганд. Например, введение углеводного фрагмента/лиганда (например, для GalNAc) на 3'-конце последовательности осуществляли, начиная синтез с помощью твердой подложки с соответствующим углеводом. Аналогичным образом, холестеринный фрагмент на 3'-конце вводили, начиная синтеза на подложке с холестерином. Обычно фрагмент лиганд связывали с *транс*-4-гидроксипролином через выбранную связь, как описано в предшествующих примерах, с получением фрагмента гидроксипролин-лиганд. Затем фрагмент гидроксипролин-лиганд связывали с твердой подложкой через сукцинатный линкер или превращали в фосфоамидит с помощью стандартных условий фосфорилирования с получением необходимых структурных блоков на основе конъюгата углевода. Меченные флуорофором siRNA синтезировали на твердой подложке с соответствующим фосфоамидитом, приобретенной у Biosearch Technologies. Полимерную подложку с олеиллихолевой кислотой (GalNAc)₃ получили в лаборатории при загрузке 38,6 мкмоль/грамм. Полимерную подложку с маннозой (Man)₃ получили в лаборатории при загрузке 42,0 мкмоль/грамм.

Конъюгирование выбранного лиганда в необходимом положении, например, на 5'-конце последовательности, осуществляли путем связывания соответствующего фосфоамидита с растущей цепью в стандартных условиях фосфоамидитного связывания, если не указано иное. Связывание 0,1 М раствора фосфоамидита в безводном CH₃CN в присутствии активатора 5-(этилтио)-1*H*-тетразола с олигонуклеотидом, связанным на твердой подложкой, выполняли в течение 15 минут. Окисление межнуклеотидного фосфита до фосфата выполняли с использованием стандартной смеси йод-вода, как описано (1), или путем обработки смесью *трет*-бутилгидропероксид/ацетонитрил/вода (10: 87: 3), при этом продолжительность окисления конъюгированного олигонуклеотида

составляла 10 минут. Фосфоротиоат вводили путем окисления фосфита до фосфоротиоата с использованием реагента для переноса серы, такого как DDTT (приобретенного у AM Chemicals), PADS и/или реагента Бокажа. Холестерин-фосфорамидит синтезировали в лаборатории и использовали при концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время связывания для холестерин-фосфорамидита составляло 16 минут.

2. Снятие защиты-I (снятие защиты с нуклеинового основания)

После завершения синтеза подложку переносили в 100 мл стеклянный флакон (VWR). Олигонуклеотид отделяли от подложки с одновременным снятием защиты с основания и фосфатных групп с помощью 80 мл смеси спиртового аммиака [аммиак:этанол (3:1)] в течение 6,5 часа при 55°C. Флакон быстро охлаждали на льду, а затем смесь на основе спиртового аммиака фильтровали в новый 250 мл флакон. CPG промывали с помощью 2 x 40 мл порций смеси этанол/вода (1:1 объем/объем). Объем смеси затем уменьшали до ~ 30 мл при помощи роторного испарителя. Затем смесь замораживали на сухом льду и сушили в условиях вакуума на скоростной вакуумной установке.

3. Снятие защиты II (удаление группы 2' -TBDMS)

Высушенный остаток ресуспендировали в 26 мл смеси триэтиламина, триэтиламинтригидрофторида (TEA.3HF) или пиридина-NF и DMSO (3:4:6) и нагревали при 60°C в течение 90 минут для удаления *трет*-бутилдиметилсилильных (TBDMS) групп в 2'-положении. Затем реакционную смесь гасили с использованием 50 мл 20 мМ ацетата натрия и значение pH доводили до 6,5, при этом хранили в морозильной камере до очистки.

4. Анализ

Перед очисткой олигонуклеотиды анализировали при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), а выбор буфера и колонки зависел от природы последовательности и/или конъюгированного лиганда.

5. Очистка при помощи HPLC

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды очищали при помощи препаративной HPLC с обращенной фазой. Неконъюгированные олигонуклеотиды очищали при помощи анионообменной HPLC на

колонке с TSKgel, набитой в лаборатории. Буферы представляли собой 20 мМ фосфат натрия (рН 8,5) в 10% CH₃CN (буфер А) и 20 мМ фосфат натрия (рН 8,5) в 10% CH₃CN, 1 М NaBr (буфер В). Фракции, содержащие олигонуклеотиды полной длины, объединяли, обессоливали и лиофилизировали. Приблизительно 0,15 OD обессоленных олигонуклеотидов разбавляли в воде до 150 мкл, а затем отмеряли пипеткой в специальные флаконы для CGE- и LC/MS-анализа. Наконец, соединения анализировали при помощи LC-ESMS и CGE.

6. Получение siRNA

Для получения siRNA эквимольные количества смысловой и антисмысловой нити нагревали в 1хPBS при 95°C в течение 5 минут и медленно охлаждали до комнатной температуры. Целостность дуплекса подтверждали с помощью HPLC-анализа.

Пример 3. Активность *in vitro* сайленсинга при использовании siRNA ANGPTL3 с разными химическими модификациями

Культура клеток и трансфекции

Клетки Hep3В (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в RPMI (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), до отделения от культуральной чашки путем обработки трипсином. Трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл siRNA-дуплексов на лунку в 96-луночной планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. 80 мкл полной питательной среды без антибиотика, содержащей ~2 x 10⁴ клеток Hep3В, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение либо 24 часов, либо 120 часов перед очисткой РНК. Если не указано иное, эксперименты с использованием однократной дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты для определения эффекта дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 и 0,00001 нМ.

Синтез кДНК с использованием набора ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Фостер-Сити,

Калифорния, № по кат. 4368813)

Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли к 10 мкл общей РНК. кДНК получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин., 37°C 120 мин., 85°C 5 с, хранение при 4°C.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для ANGPTL (Applied Biosystems, № по кат. Hs00205581_m1) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 50-ти 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе ABI 7900HT Real Time PCR (Roche) с использованием $\Delta\Delta C_t$ (RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали по двух независимым трансфекциям и каждую трансфекцию оценивали в двух повторностях, если иное не указано в сводных таблицах.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955, или ложно-трансфицированными клетками. IC₅₀ рассчитывали с помощью модели подбора по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно клеток, трансфицированных AD-1955, или наивных клеток при таком же диапазоне доз, или относительно собственной наиболее низкой дозы. Последовательность AD-1955, которую применяли в качестве отрицательного контроля, целенаправленно воздействует на люциферазу и имеет следующую последовательность:

смысловая нить: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT;

антисмысловая нить: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT.

Описанные выше различные варианты осуществления можно комбинировать для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. Все патенты США, публикации заявок на патент США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и не относящиеся к патентам публикации, упомянутые в данном описании,

включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Аспекты вариантов осуществления можно модифицировать, если необходимо использовать идеи различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения можно осуществлять в вариантах осуществления в свете подробного описания выше. В целом, в нижеследующей формуле изобретения, используемые термины не должны истолковываться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в данном описании и формуле изобретения, но должны истолковываться так, чтобы включать все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, применимых в отношении таких пунктов формулы. Соответственно, формула изобретения не ограничивается данным раскрытием.

Пример 4. Химические модификации в siRNA и *in vitro* сайленсинг с использованием модифицированных siRNA

Конструирование смысловой нити

Конструирование лиганда и сайта конъюгации

Смысловую нить конъюгировали с лигандом GalNAc в 3'-положении, так же как в исходном соединении.

Положение 11 смысловой нити

Положение 11 смысловой нити в гипотетическом сайте расщепления (противоположном положению 11 антисмысловой нити (AS), если длина смысловой нити составляет 21 нуклеотид, а длина антисмысловой нити составляет 23 нуклеотида) модифицировали с помощью модификации, чувствительной к нуклеазе (например, ДНК). Данные статистического анализа, охватывающего множество различных конъюгатов, позволяют предположить важность данного положения.

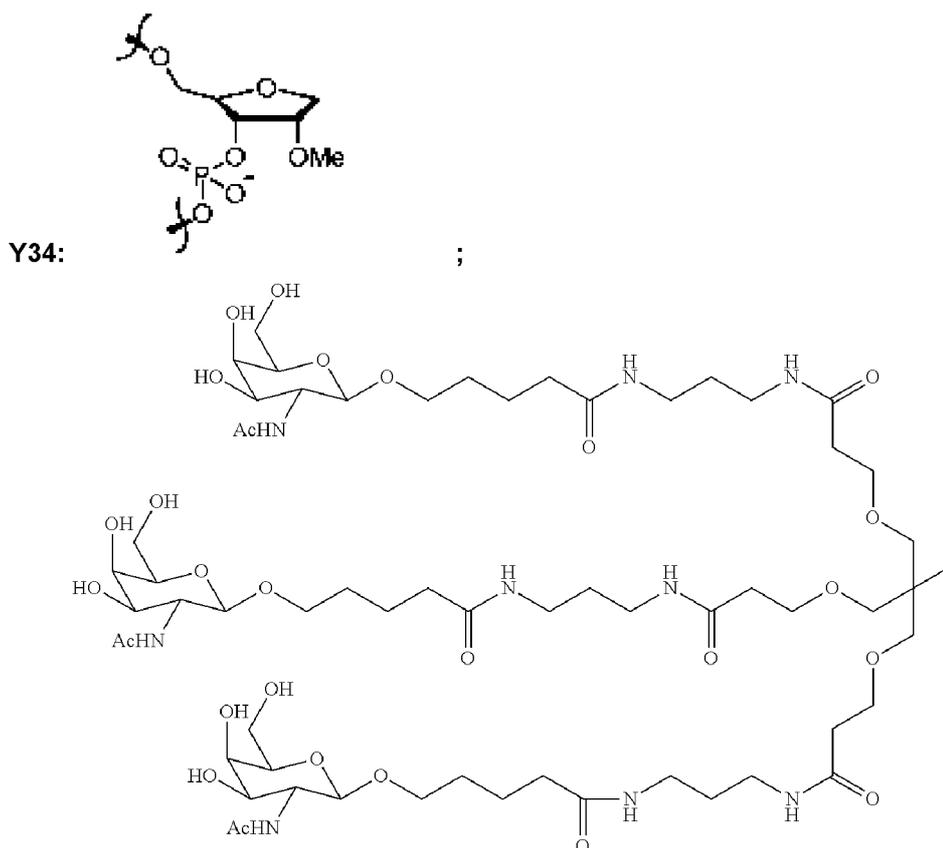
Нарушение термостабильности 3'-участка смысловой нити (положения 16-18)

Данный участок модифицировали с помощью нарушающих термостабильность модификаций, таких как GNA или ошибочного спаривания оснований с противоположной AS-нитью. Модификации положения 16 или 17, по-видимому, являются наиболее

результативными. На фигуре 1 и в таблице 1 отмечены это положение/участок и эффект нарушения термостабильности на *in vitro* эффективность. Эффективный нокдаун, сравнимый с таковым у исходной матрицы, получали при GNA или других нарушающих термостабильность модификаций, таких как удаление азотистого основания (Y34) или ошибочные спаривания оснований с антисмысловой нитью. С другой стороны, в целом снижение сайленсинга наблюдали для 2'-ОМе- или ДНК-модификаций нити, комплементарной противоположной AS-нити.

Таблица 1. Положение 17 смысловой нити: последовательность и модификации siRNA, которые оценивали in vitro (см. фигуру 1)

Мишень	ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Модификация	10 нМ	SD	0,1 нМ	SD
mTTR	AD-57727.21	A-117799.49	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	A-117800.20	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	Исходная	3,4	1,2	12,6	3,6
mTTR	AD-61291.1	A-123259.1	asascaguguucdTugcucuuaal96	A-117800.29	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	2'-OMe	46,3	6,8	39,3	13,7
mTTR	AD-61297.1	A-123260.1	asascaguguucdTugcucdTauaal96	A-117800.30	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	ДНК	43,0	10,0	35,2	8,9
mTTR	AD-61377.1	A-123316.1	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaal96	A-117800.38	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	GNA	14,9	6,4	19,1	7,0
mTTR	AD-61364.1	A-123260.9	asascaguguucdTugcucdTauaal96	A-123268.5	usdTsauagagcdAagadAcacuguususu	ДНК	27,1	9,6	43,5	19,9
mTTR	AD-61398.1	A-123316.9	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaal96	A-123268.6	usdTsauagagcdAagadAcacuguususu	GNA	13,4	6,2	17,8	4,8
mTTR	AD-57727.41	A-117799.131	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	A-117800.71	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	Исходная	10,3	3,1	43,0	5,6
mTTR	AD-64426.1	A-128287.1	asascaguguucdTugcucY34auaal96	A-117800.76	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	Без азот. основ.	18,1	2,7	51,5	10,0
mTTR	AD-64392.1	A-128288.1	asascaguguucdTugcucuuaal96	A-117800.77	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	a:a mm	33,8	3,4	50,9	4,9
mTTR	AD-64397.1	A-128289.1	asascaguguucdTugcuccauaal96	A-117800.78	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	c:a mm	27,3	4,2	49,4	8,1
mTTR	AD-64403.1	A-128290.1	asascaguguucdTugcucgaaal96	A-117800.79	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	g:a mm	34,6	3,7	62,0	8,4
mTTR	AD-64411.1	A-128305.1	asascaguguucdTugcucUuaal96	A-123268.13	usdTsauagagcdAagadAcacuguususu	PHK	56,8	7,4	90,2	15,6
mTTR	AD-64421.1	A-128290.2	asascaguguucdTugcucgaaal96	A-123268.15	usdTsauagagcdAagadAcacuguususu	g:a mm	14,7	1,9	64,3	3,5
ANG	AD-57927.7	A-117426.25	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfl96	A-117427.23	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	Исходная	7,5	1,9	29,6	7,0
ANG	AD-63144.2	A-126526.4	ascsauuuugadTcaguc(Tgn)uuuuL96	A-117427.28	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	GNA в 17	11,9	7,7	37,5	12,1
ANG	AD-64744.1	A-129588.1	ascsauuuugadTcagucdTuuuuL96	A-117427.31	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	ДНК	16,6	1,4	57,4	9,8
ANG	AD-64761.1	A-129591.1	ascsauuuugadTcagucdGuuuuL96	A-117427.34	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	dG:A mm	12,7	5,7	36,7	6,4
ANG	AD-64767.1	A-129592.1	ascsauuuugadTcagucdCuuuuL96	A-117427.35	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	dC:A mm	13,2	5,8	39,0	9,5
ANG	AD-64772.1	A-129593.1	ascsauuuugadTcagucdAuuuuL96	A-117427.36	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	dA:A mm	11,8	2,7	50,0	1,7
АpoC3	AD-64787.1	A-117361.23	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfl96	A-129546.17	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	Исходная	8,2	3,8	45,0	24,0
АpoC3	AD-64823.1	A-129551.2	gscsuuaaaaggdGacaguuuuL96	A-129546.21	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	2'-OMe	33,1	7,7	110,5	9,3
АpoC3	AD-64806.1	A-129556.2	gscsuuaaaaggdGacagudAuuuL96	A-129546.26	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	ДНК	52,1	13,8	103,8	28,7
АpoC3	AD-64794.1	A-129554.4	gscsuuaaaaggdGacagu(Agn)uuuuL96	A-129546.24	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	GNA	8,7	2,1	50,2	15,9
АpoC3	AD-64829.1	A-129560.2	gscsuuaaaaggdGacaguuuuL96	A-129546.30	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	g:u mm	25,5	10,3	75,8	18,4
АpoC3	AD-64789.1	A-129561.2	gscsuuaaaaggdGacaguuuuL96	A-129546.31	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	c:u mm	21,8	6,1	39,7	5,7
АpoC3	AD-64795.1	A-129562.2	gscsuuaaaaggdGacaguuuuL96	A-129546.32	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	u:u mm	19,9	6,3	54,2	10,1
АpoC3	AD-64812.1	A-129557.4	gscsuuaaaaggdGacagudTuuuuL96	A-129546.27	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfaAfaGfcsasa	dT:u mm	18,2	6,1	59,3	19,9
TTRSC	AD-64474.1	A-128493.1	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfl96	A-128494.1	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	Исходная	17,3	10,2	72,2	13,5
TTRSC	AD-64493.1	A-128505.1	usgsggauuucadTguaaccaagaL96	A-128494.8	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	2'-OMe	43,3	25,6	100,1	9,6
TTRSC	AD-64460.1	A-128507.1	usgsggauuucadTguaacdCaagaL96	A-128494.10	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	ДНК	18,7	6,2	81,0	8,7
TTRSC	AD-64455.1	A-128506.1	usgsggauuucadTguaac(Cgn)aagaL96	A-128494.9	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	GNA	26,1	12,9	68,0	14,8
TTRSC	AD-64482.1	A-128511.1	usgsggauuucadTguaacuaagaL96	A-128494.14	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	u:g mm	19,0	8,2	96,2	14,5
TTRSC	AD-64488.1	A-128512.1	usgsggauuucadTguaacaaagaL96	A-128494.15	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	a:g mm	19,4	4,1	72,6	7,9
TTRSC	AD-64494.1	A-128513.1	usgsggauuucadTguaaccaagaL96	A-128494.16	usCfsuUfgGfuUfaCfaugaAfaAfuCfcCfasusc	g:g mm	29,8	11,6	93,9	13,1

**L96:**

На фигуре 2 и в таблице 2 показан эффект положения нарушающей термостабильность модификации GNA для всего 3'-участка (положения 16-18). Данные результаты указывают на то, что GNA-модификации в положениях 16 и 17 показали хорошую эффективность, аналогичную исходной конструкции, тогда как GNA в положении 18 показала снижение активности.

Таблица 2. Эффект положения GNA-обусловленного нарушения термостабильности: последовательность и модификации siRNA, которые оценивали *in vitro* (см. фигуру 2)

Мишень	ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Модификация	10 нМ	SD	0,1 нМ	SD
ANG	AD-57927.7	A-117426.25	AfscsAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUfL96	A-117427.23	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	Исходная	7,5	1,9	29,6	7,0
ANG	AD-64766.1	A-129585.1	ascsauuuugadTcagu(Cgn)uuuuL96	A-117427.27	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	GNA в 16	11,3	5,4	38,8	11,3
ANG	AD-63144.2	A-126526.4	ascsauuuugadTcaguc(Tgn)uuuuL96	A-117427.28	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	GNA в 17	11,9	7,7	37,5	12,1
ANG	AD-64777.1	A-129586.1	ascsauuuugadTcagucu(Tgn)uuuuL96	A-117427.29	asAfsaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusug	GNA в 18	19,8	3,7	65,8	6,8
ApoC3	AD-64787.1	A-117361.23	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129546.17	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	Исходная	8,2	3,8	45,0	24,0
ApoC3	AD-64788.1	A-129553.5	gscsuuaaaaggdGacag(Tgn)uuuL96	A-129546.23	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	GNA в 16	15,9	3,4	69,2	11,6
ApoC3	AD-64794.1	A-129554.4	gscsuuaaaaggdGacagu(Agn)uuuL96	A-129546.24	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	GNA в 17	8,7	2,1	50,2	15,9
ApoC3	AD-64800.1	A-129555.2	gscsuuaaaaggdGacagua(Tgn)uuuL96	A-129546.25	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	GNA в 18	37,9	10,2	96,0	13,8

Таблица 3. Положение 2 антисмысловой нити: последовательность и модификации siRNA, которые оценивали *in vitro* (см. фигуру 3)

Мишень	ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Модификация	10 нМ	SD	0,1 нМ	SD
mTTR	AD-57727.41	A-117799.13	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaAfaL96	A-117800.71	usUfsaUfaGfaGfcAfaGfaCfcUfgUfususu	Исходная	10,3	3,1	43,0	5,6
mTTR	AD-61398.5	A-123316.21	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-123268.11	usdTsauagagcdAagadAcacuguuususu	ДНК	15,3	2,2	49,6	6,5
mTTR	AD-64393.1	A-123316.23	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-128294.1	usUsauagagcdAagadAcacuguuususu	2'-ОМе	42,4	5,0	79,7	6,8
mTTR	AD-64415.1	A-123316.27	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-128298.1	usUsauagagcdAagadAcacuguuususu	PHK	19,1	1,6	61,7	9,9
ApoC3	AD-64787.1	A-117361.23	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129546.17	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	Исходная	8,2	3,8	45,0	24,0
ApoC3	AD-64802.1	A-117361.33	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129571.5	asdGsaauacugdTcccdTuuaagcsasa	ДНК	34,2	11,0	63,9	10,1
ApoC3	AD-64790.1	A-117361.31	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129569.2	asgsaaucugdTcccdTuuaagcsasa	2'-ОМе	131,8	46,9	84,5	8,5
TTRSC	AD-64474.1	A-128493.1	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128494.1	usCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc	Исходная	17,3	10,2	72,2	13,5
TTRSC	AD-64472.1	A-128493.14	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128525.1	usdCsuugguuadCaugdAaaucccasusc	ДНК	24,8	13,1	84,3	27,0
TTRSC	AD-64484.1	A-128493.16	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128527.1	uscsuugguuadCaugdAaaucccasusc	2'-ОМе	39,9	17,1	126,6	44,6
TTRSC	AD-64496.1	A-128493.18	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128529.1	usCsuugguuadCaugdAaaucccasusc	PHK	88,6	31,5	102,3	28,1
TMP	AD-60940.7	A-122745.22	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96	A-122746.24	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsasg	Исходная	32,2	14,2	66,5	12,1
TMP	AD-64567.1	A-126602.4	cs.usgguuuuuccCuaggg(Tgn)acaaL96	A-129067.1	usdTsguaccudAggadAauaccagsasg	ДНК	62,4	15,4	87,2	23,8
TMP	AD-64586.1	A-126602.7	cs.usgguuuuuccCuaggg(Tgn)acaaL96	A-129085.1	usUsguaccudAggadAauaccagsasg	PHK	48,9	16,0	88,6	37,1

Конструирование антисмысловой нитиПоложение 2 AS

Данное положение было выявлено путем статистического анализа большого массива данных о конъюгатах и посредством методики "прогулка по положениям" на всем протяжении AS-нити, как чувствительное к стерически требовательным 2'-модификациям, включая 2'-ОМе. Однако авторы настоящего изобретения установили, что некоторые модификации, в том числе ДНК, а в некоторых случаях и РНК, а также другие модификации, не придающие стерический объем в 2'-положении, могут быть вполне допустимыми в контексте конструкций с модификациями, не содержащими F. Результаты исследований *in vitro* сайленсинга обобщены на фигуре 3 и в таблице 3, и они указывают на то, что конструкции с ДНК, а также РНК в положении 2 в целом сохраняют активность конструкций с модификациями, не содержащими F, аналогичную конструкциям в виде исходной матрицы, тогда как 2'-ОМЕ-модификация в целом не является вполне допустимой и приводит к снижению активности.

Положение 14 AS

Данное положение было выявлено путем статистического анализа большого массива данных о конъюгатах и посредством методики "прогулка по положениям" на всем протяжении AS-нити, как чувствительное к стерически требовательным 2'-модификациям, включая 2'-ОМе. Однако было установлено, что некоторые модификации, в том числе ДНК, а в некоторых случаях и РНК, а также другие модификации, не придающие стерический объем в 2'-положении, могут быть вполне допустимыми в контексте конструкции с модификациями, не содержащими F. Результаты исследований *in vitro* сайленсинга обобщены на фигуре 4 и в таблице 4, и они указывают на то, что конструкции с ДНК, а также РНК в положении 14 в целом сохраняют активность конструкций с модификациями, не содержащими F, аналогичную конструкциям в виде исходной матрицы, тогда как 2'-ОМЕ-модификация в целом не является вполне допустимой и приводит к снижению активности.

Таблица 4. Положение 14 антисмысловой нити: Последовательность и химические структуры siRNA, которые оценивали *in vitro* (см. фигуру 4)

Мишень	ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Модификация	10 нМ	SD	0,1 нМ	SD
mTTR	AD-57727.41	A-117799.13	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	A-117800.71	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	Исходная	10,3	3,1	43,0	5,6
mTTR	AD-61398.5	A-123316.21	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-123268.11	usdTsaauagagcdAagadAcacuguuususu	ДНК	15,3	2,2	49,6	6,5
mTTR	AD-64273.2	A-123316.29	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-128300.1	usdTsaauagagcdAagaAcacuguuususu	РНК	14,3	2,2	64,2	9,0
mTTR	AD-64132.1	A-123316.13	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-128243.1	usdTsaauagagcdAaga(Aln)cacuguuususu	LNA	45,5	2,1	69,5	9,6
АpoC3	AD-64787.1	A-117361.23	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129546.17	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsasa	Исходная	8,2	3,8	45,0	24,0
АpoC3	AD-64802.1	A-117361.33	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129571.5	asdGsaauacugdTcccdTuuaaagcsasa	ДНК	34,2	11,0	63,9	10,1
АpoC3	AD-64831.1	A-117361.38	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96	A-129576.2	asdGsaauacugdTccclUuuuaagcsasa	РНК	20,7	4,2	63,8	9,0
TTRSC	AD-64474.1	A-128493.1	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128494.1	usCfsuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasusc	Исходная	17,3	10,2	72,2	13,5
TTRSC	AD-64472.1	A-128493.14	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128525.1	usdCsuugguadCaugdAaaucccasusc	ДНК	24,8	13,1	84,3	27,0
TTRSC	AD-64458.1	A-128493.19	UfsgsGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgAfL96	A-128530.1	usdCsuugguadCaugAaaucccasusc	РНК	15,1	6,6	60,0	10,8
TTRSC	AD-64515.1	A-128506.2	usgsggauuucadTguaac(Cgn)aagaL96	A-128525.2	usdCsuugguadCaugdAaaucccasusc	ДНК	20,5	10,8	62,3	13,8
TTRSC	AD-64504.1	A-128506.4	usgsggauuucadTguaac(Cgn)aagaL96	A-128530.2	usdCsuugguadCaugAaaucccasusc	РНК	26,0	13,2	60,2	19,1

Таблица 5. Последовательность и химические структуры siRNA, которые целенаправленно воздействуют на mTTR, используемые в *in vivo* исследовании на мышах

ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Конструкция
AD-57727	A-117799	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUf:	A-117800	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	исходная
AD-61398	A-123316	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-123268	usdTsaauagagcdAagadAcacuguuususu	исходная с мотивом без F
AD-64273	A-123316	asascaguguucdTugcuc(Tgn)auaaL96	A-128300	usdTsaauagagcdAagaAcacuguuususu	AS: PHK в 14

Оценка *in vivo*siRNA, целенаправленные воздействующие на mTTR

Животным (n=3/группа) вводили однократную дозу siRNA, составляющую 2,5 мг/кг, при этом уровни сывороточного белка FVII измеряли перед введением дозы и в дни 4, 7, 13, 22, 29 и 36. На фигуре 5 показан профиль концентрации белка FVII-время для 2 siRNA AD-61398 и 64273 с модификацией, не содержащей F, в сравнении с исходным соединением AD-57727. На фигуре 6 снижение уровня белка mTTR через 96 ч. после введения дозы показано для двух siRNA с модификациями, не содержащими F, при трех различных уровнях дозы в сравнении с исходными соединениями. На фигуре 7 показаны профили снижения уровня сывороточного белка mTTR для режима с повторным введением дозы (1 мг/кг, QW) до 42 дня включительно (всего 6 доз).

В целом данные исследования указывают на то, что siRNA AD-61398 и AD-642733 с модификациями, не содержащими F, проявляли *in vivo* эффективность и активность, аналогичные конструкции в виде исходной матрицы.

siRNA, целенаправленные воздействующие на TMPRSS6

Таблица 6. Последовательности и химические структуры siRNA, целенаправленно воздействующих на TMPRSS6

ID дуплекса	ID смысловой нити	Последовательность смысловой нити	ID AS	Последовательность антисмысловой нити	10 нМ		0,1 нМ	
					Средн. знач.	SD	Средн. знач.	SD
AD-60940,7	A-122745,22	CfsusGfgUfaUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAFL96	A-122746,24	usUfsgUfaCfcCfuAfggaAfaUfaCfcAfgsag	32,2	14,2	66,5	12,1
AD-64604,1	A-129074,2	csusgguaTuucdCuaggg(Tgn)acaal96	A-129085,2	usUsguaccudAggadAauaccagsasg	25,2	10,2	57,5	27,9
AD-64601,1	A-129073,1	csusggudAuuucdCuaggg(Tgn)acaal96	A-129067,6	usdTsguaccudAggadAauaccagsasg	23,0	8,6	74,7	17,7
AD-64567,1	A-126602,4	csusgguaauucdCuaggg(Tgn)acaal96	A-129067,1	usdTsguaccudAggadAauaccagsasg	62,4	15,4	87,2	23,8
AD-64569,1	A-129083,1	csusgguaTuucdCuagggdAacaal96	A-129067,16	usdTsguaccudAggadAauaccagsasg	49,7	9,4	49,4	19,7

Результаты указывают на отличающиеся *in vivo* эффективности конструкций с модификациями, не содержащими F, что зависит от точного местоположения модификаций и комбинации смысловой и AS-нитей. Хотя данные *in vitro* исследований позволяют предположить, что соединения с модификациями, не содержащими F, обладали активностью/эффективностью, аналогичной исходному соединению,

при этом соединение AD-64604 с модификациями, не содержащими F, которое оказалось наиболее активным *in vivo*, все еще было значительно менее эффективным, чем исходное AD-60940 (см. фигуру 8).

Провели дополнительные усовершенствования конструкции с модификациями, не содержащими F, и провели их оценку, данные которой обобщены в таблице 7. На фигуре 9 показан сайленсинг мРНК TMPRSS6 в печени через 7 дней после SC введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг.

Таблица 7. Последовательность и химические структуры 2-го набора siRNA, целенаправленно воздействующих на TMPRSS6

ID дуплекса	ID смысл. н.	Смысловая нить (5' – 3')	ID AS	Антисмысловая нить (5' – 3')	Исходная
AD-64601	A-129073.2	csusggudAuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129067.18	uscTsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65105	A-129073.2	csusggudAuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129085.5	usUsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65106	A-129073.2	csusggudAuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129086.2	uscTsguacccudAsggadAsauaccagsag	AD-60940
AD-65107	A-129710.1	csusggudAuuuccCuagggdAacaal96	A-129067.18	uscTsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65108	A-129710.1	csusggudAuuuccCuagggdAacaal96	A-129085.5	usUsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65109	A-129710.1	csusggudAuuuccCuagggdAacaal96	A-129086.2	uscTsguacccudAsggadAsauaccagsag	AD-60940
AD-65110	A-130024.1	csusggudAsuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129067.18	uscTsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65111	A-130024.1	csusggudAsuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129085.5	usUsguacccudAggadAauaccagsag	AD-60940
AD-65112	A-130024.1	csusggudAsuuuccCuaggg(Tgn)acaal96	A-129086.2	uscTsguacccudAsggadAsauaccagsag	AD-60940
AD-65104	A-129875.1	ussguadTuuccdTagggudTcaal96	A-129876.1	uscTsuquacccudTaggdAauaccagsa	AD-61002

На фигуре 9 показано, что усовершенствование дало по меньшей

мере одно соединение с модификацией, не содержащей F (AD-65105), *in vivo* эффективность которого была сравнима с исходным соединением (AD-60940). Данное соединение содержит смысловую нить с ДНК в положениях 6 и 11 и антисмысловую нить с РНК в положении 2 и ДНК в положениях 10, 14.

Конструирование мотива

При конструировании мотива смысловую нить конъюгировали с лигандом GalNAc в 3'-положении с применением такой же процедуры, которую применяли для исходного соединения. Дополнительные мотивы конструировали в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Характерные последовательности перечислены в таблице 8.

Таблица 8. Характерные последовательности

Название дуплекса	Нить	Последовательности
AD-57727	S	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96
	AS	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu
AD-57553	S	GfscsUfuAfaAfaGfGfGfaCfaGfuAfuUfcUfL96
	AS	asGfsaAfuAfcUfgUfcccUfuUfuAfaGfcsAfsa
AD-63042	S	CfsusUfgCfuCfuAfUfAfaAfcCfgUfgUfuAfL96
	AS	usAfsaCfaCfgGfuUfuauAfgAfgCfaAfgsasa
AD-63085	S	UfscsCfuCfuGfaUfGfGfuCfaAfaGfuCfcUfL96
	AS	asGfsgAfcUfuUfgAfccaUfcAfgAfgGfascsa
AD-65703	S	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucaL96
	AS	usGfsaauAfcUfGfucccUfuUfuaagcsasa
AD-65704	S	gscsuuaaAfaGfGfGfacaguauucaL96
	AS	usGfsaauacugucccUfuuaagcsasa

Результаты *in vitro* исследований

На фигуре 10 показано, что среди десяти последовательностей, представляющих три мишени, как установлено, два мотива, **мотив 1** (шесть фосфоротиоатных модификаций межнуклеотидных связей в смысловой и антисмысловой нитях; четыре 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11 смысловой нити от 5'-конца смысловой нити и четыре 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 антисмысловой нити от 5'-конца антисмысловой нити) и **мотив 2** (шесть фосфоротиоатных модификаций межнуклеотидных связей в смысловой и антисмысловой нитях; четыре 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11 смысловой нити от 5'-конца смысловой нити и шесть 2'-F-

модификаций в положениях 2, 6, 8-9, 14 и 16 антисмысловой нити от 5'-конца антисмысловой нити) характеризуются статистически значимым увеличением активности в сравнении с исходным соединением AD-57727.

Оценка *in vivo*

Сайленсинг мишени под действием siRNA оценивали с помощью qPCR. Эффективность мотивов оценивали по целенаправленному воздействию на mTTR. Животным (n=3/группа) вводили однократную дозу siRNA, составляющую 3 мг/кг, при этом уровни белка в печени измеряли вначале перед введением дозы, а затем в дни 7 и 22, как показано на фигуре 11.

На фигуре 12 показана усиленная активность при использовании конъюгатов со структурой, улучшающей стабильность (SEC-C), при этом образцы печени оценивали в отношении активности (мРНК) в день 7 после введения дозы. Животные получали однократную дозу, составляющую 3 мг/кг (s.c.). Эти данные демонстрируют влияние мотивов на *in vivo* активность.

На фигуре 13 показана повышенная активность (примерно 4-кратное увеличение активности) в случае новых мотивов (мотивы 1 и 2) в сравнении с исходным соединением, при этом данные оценивали в день 7 после введения. Эти данные демонстрируют влияние мотивов на *in vivo* активность. Кратное увеличение наблюдалось стабильно для всех последовательностей.

На фигуре 14 показана существенно увеличенная продолжительность действия для всех трех последовательностей, что демонстрирует, что новые мотивы проявляют увеличенную продолжительность действия.

На фигуре 15 показаны результаты для ApoC3-GalNAc3 SAR при SC введении однократной дозы, составляющей 3 мг/кг

hAAV 1×10^{11} GC/мышь.

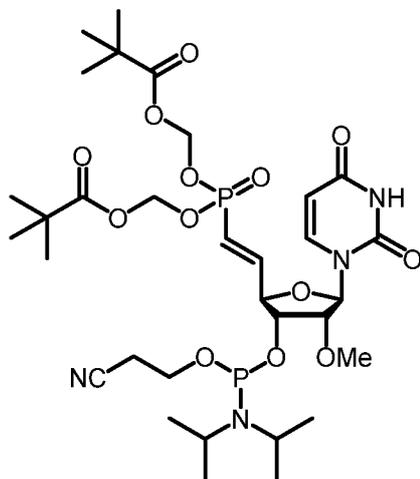
Пример 5. VP- и PS₂-модификации на 5'-конце антисмысловой нити

Ниже изложены иллюстративные протоколы для синтеза олигонуклеотидов, содержащих 5'-винилфосфонат (VP), и синтеза олигонуклеотидов, содержащих 2'-дезокситимидин, связанный посредством фосфородитиоатной (PS₂) связи на 5'-конце

олигонуклеотида. Специалист в данной области поймет, что такие же или аналогичные методики можно использовать для синтеза аналогичных олигонуклеотидов. Другие методики синтеза, известные специалистам в данной области, можно также использовать для синтеза и получения данных и аналогичных олигонуклеотидов и модификаций, в том числе без ограничения методики синтеза, раскрытые в Whittaket et al., "Stereoselective synthesis of highly functionalized P-stereogenic nucleosides via palladium-catalyzed P-C cross-coupling reactions," *Tetrahedron Letters* 49: 6984-87 (2008); Zhao and Caruthers, "Synthesis and Preliminary Biochemical Studies with 5'-Deoxy-5'-methylidyne Phosphonate Linked Thymidine Oligonucleotides," *Tetrahedron Letters* 37(35): 6239-42 (1996); и публикации заявки на патент США № 2013/0084576, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Протоколы для синтеза олигонуклеотидов, содержащих 5'-винилфосфонат

Введение пивалоилоксиметил-(POM)-защищенного VP

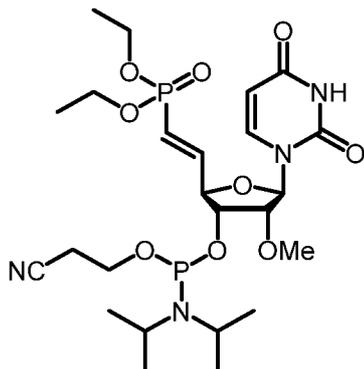


Связывание и окисление. Связывание амидита проводили при стандартных условиях синтеза с использованием 0,25 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле для активации. Осуществляли стандартные протоколы тиолирования с применением либо 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тиона (DDTT), либо фенилацетилдисульфида (PADS) для превращения сложного фосфитного триэфира в фосфотриатионатную связь. Поскольку винилфосфонатный структурный блок не содержит защитную группу

DMT в 5'-положении, то конечную стадию детритилирования не проводили.

Снятие защитных групп и отщепление. После синтеза проводили снятие защитных групп с винилфосфонат-содержащих олигонуклеотидов в смеси 3:1 водного раствора NH_3 и EtOH с добавлением 1-2,5% по объему 40% раствора метиламина в течение 5 часов при 60°C или 16 часов при 35°C .

Введение этил-защищенного VP

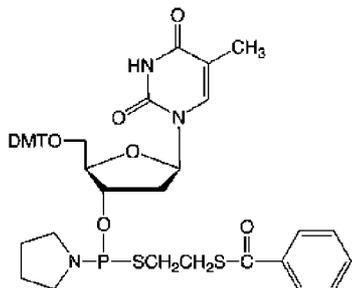


Связывание и окисление. Связывание амидита проводили при стандартных условиях синтеза с использованием 0,25 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле для активации. Осуществляли стандартные протоколы тиолирования с применением либо 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тиона (DDTT), либо фенилацетилдисульфида (PADS) для окисления сложного фосфитного триэфира и введения фосфоротиоатной связи. Поскольку винилфосфонатный структурный блок не содержит защитную группу DMT в 5'-положении, то конечную стадию детритилирования не проводили.

Снятие защитных групп и отщепление. Готовили раствор ацетонитрила (ACN) и пиридина (Pyr) 50:1 (объем/объем) и добавляли молекулярные сита с размером пор 3Å для поддержания смеси в максимально сухом состоянии. В данную смесь добавляли 3,5 мл (5 г) триметилсилилиодида (TMSI) на каждые 135 мл раствора ACN/Pyr. Данный раствор должен быть свежеприготовленным, поскольку максимальный срок его хранения составляет один день. Затем готовили 0,5 М раствор меркаптоэтанола в смеси 1:1 (объем/объем) ацетонитрил-триэтиламин и добавляли молекулярные сита с размером пор 3Å.

Когда 5'-VP-содержащий олигонуклеотид находился на смоле и в колонке для синтеза, раствор TMSI медленно добавляли в количестве приблизительно 5-10 объемов колонки и обеспечивали прохождение реакции в течение 15 мин. Данную стадию повторяли дважды, что приводило к общему времени воздействия, составлявшему приблизительно 45 минут. Затем смолу тщательно промывали с помощью ACN с последующим пропусканием через колонку потока раствора меркаптоэтанола в количестве, составляющем приблизительно 5-10 объемов колонки, обеспечивая прохождение реакции в течение 10 мин. Данную стадию повторяли однократно при общем времени воздействия 20 минут. После еще одного тщательного промывания с помощью ACN, проводили снятие защитных групп с олигонуклеотида, связанного с подложкой, и его отщепляли от подложки с использованием стандартных условий.

Протокол синтеза олигонуклеотидов, содержащих 2'-дезокситимидин, связанный посредством фосфордитионатной связи, на 5'-конце олигонуклеотида



Связывание и окисление. Раствор фосфорамидита готовили из коммерчески доступного dT-тиофосфорамидита (Glen Research) в соответствии с протоколом производителя в сухом ацетонитриле при концентрации 0,15 М. Связывание проводили в стандартных условиях с использованием 0,25 М 5-(этилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле в течение общего времени связывания, составляющего 17 минут. В данном цикле синтеза стадию кэпирования не проводили. Окисление (тиолирование) проводили с использованием 3-(диметиламинометил)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тиона (DDTT) путем продления времени введения реагента и времени реакции до 3 x 10 минут. Конечное детритилирование проводили с использованием стандартных условий синтеза.

Снятие защитных групп и отщепление. Твердую подложку (в

колонке) промывали с помощью 0,5 М пиперидина в ACN (время воздействия 2 x 15 минут) перед тем, как перенести смолу в подходящий контейнер и обработать в стандартных условиях (например, смесью 3:1 водного раствора NH:EtOH в течение 5 часов при 60°C или 16 часов при 35°C) для отщепления от твердой подложки и снятия защитных групп с олигонуклеотида.

Остальные процедуры способа синтеза олигонуклеотидов аналогичны процедурам, описанным в примере 2.

На фигуре 16 показано схематическое изображение Ago2 с включенной в него siRNA. В целом 5'-фосфат-функционализированные siRNA (конъюгаты ESC) проявляют увеличенную *in vitro* активность. К примеру, для ~80% исследованных последовательностей показано увеличение собственной эффективности при трансфицировании *in vitro* и для ~30% показано приблизительно 10-кратное увеличение IC₅₀. Однако *in vivo* происходит быстрая утрата 5'-фосфата в эндо/лизосомных компартментах. Модифицированный фосфат, 5'-винилфосфонат (5'-VP), имитирующий стабильный фосфат, также показанный на фиг. 16, присоединен к 5'-концу модифицированного олигонуклеотида. Этот фосфонат изначально был сконструирован в компании Merck.

Один вариант осуществления настоящего изобретения направлен на 5'-концевые модификации для увеличения эффективности (включения в RISC). Концевые модификации обеспечивают стабильные имитации фосфата и активируют эндогенное фосфорилирование.

На фигуре 17 изображена диаграмма, показывающая, как присутствие 5'-VP в целом увеличивает *in vivo* активность, исходя из оценки четырех разных последовательностей, нацеленных на ApoB. Уровни LDL через 7 дней после SC введения однократной дозы, составляющей 3 мг/кг, анализировали для четырех конъюгатов (с 5'-VP-модификацией или без нее). На диаграмме можно увидеть, что 3-кратное увеличение ED₅₀ наблюдается в случае определенных последовательностей, нацеленных на ApoB. Увеличение *in vivo* подтвердили с помощью дополнительных соединений/мишеней, в том числе ApoC3, Tmpssr6 и TTR. Последовательности, нацеленные на ApoB, перечислены в таблице 9.

Название дуплекса	Смысловая нить (5'-3')	Антисмысловая нить (5'-3')
AD 63750	AfsasAfgAfgGfuGfUfAfuGf gCfuUfcAfaAfL96	usUfsuGfaAfgCfcAfuacAfcCf uCfuUfuscsa
AD 64557	AfsasAfgAfgGfuGfUfAfuGf gCfuUfcAfaAfL96	VPusUfsuGfaAfgCfcAfuacAfc CfuCfuUfuscsa
AD 63734	CfsusGfgAfcAfuUfCfAfgAf aCfaAfgAfaAfL96	usUfsuCfuUfgUfuCfugaAfuGf uCfcAfgsgsg
AD 64560	CfsusGfgAfcAfuUfCfAfgAf aCfaAfgAfaAfL96	VPusUfsuCfuUfgUfuCfugaAfu GfuCfcAfgsgsg
AD 63716	UfsgsUfgAfcAfaAfUfAfuGf gGfcAfuCfaAfL96	usUfsgAfuGfcCfcAfuauUfuGf uCfaCfasasa
AD 64559	UfsgsUfgAfcAfaAfUfAfuGf gGfcAfuCfaAfL96	VPusUfsgAfuGfcCfcAfuauUfu GfuCfaCfasasa
AD 63711	CfscsUfgGfaCfaUfUfCfaGf aAfcAfaGfaAfL96	usUfscUfuGfuUfcUfgaaUfgUf cCfaGfgsgsu
AD 64561	CfscsUfgGfaCfaUfUfCfaGf aAfcAfaGfaAfL96	VPusUfscUfuGfuUfcUfgaaUfg UfcCfaGfgsgsu

На фигуре 18 изображены разные химические модификации, которые могут замещать PS-связь, в том числе фосфородитионатная (PS₂) и метилфосфонатная (MePhos), которые активируют эндогенное фосфорилирование. Модифицированные siRNA в целом не являются оптимальными субстратами для Clp1-киназы, возможно, из-за негативного влияния 2'-ОМе-модификации на первом нуклеотиде AS-нити. Однако 2'-ОМе-модификация вместе с фосфоротионатной связью желательны для защиты от экзонуклеаз. Замещение 2'-ОМе-модификация, например, на 2'F, а также модифицирование PS-связи может активировать защиту от экзонуклеаз при одновременном сохранении метаболической стабильности.

На фигуре 19 показана диаграмма оценки *in vitro* концевых модификаций, в том числе 2'-ОМе-MePhos, 2'-ОМе-PS, dn(PS₂) и 2'F-PS. На данной диаграмме показано, что для связи dn(PS₂) и 2'F-PS показана увеличенная *in vitro* активность по сравнению с исходными (2'-ОМе-PS). В частности, dn(PS)₂ была стабильной в *in vitro* анализе с тритосомами, тогда как 2'F-PS демонстрировала

склонность к метаболическому превращению. Трансфекции первичных мышечных гепатоцитов проводили с использованием двух конъюгатов, нацеленных на АроВ, при концентрации, составляющей 10 нМ и 0,1 нМ (n=4).

На фигуре 20 показаны две диаграммы, показывающие как незначительное изменение на 5'-конце антисмысловой нити может значительно увеличивать *in vivo* эффективность. На фигуре 20А показано, что 2'-F-PS в положении 1 антисмысловой нити может увеличивать активность 5'-зависимых последовательностей, а на фигуре 20В показано ~3-кратное увеличение эффективности dN(PS)₂ по сравнению с исходным соединением, это увеличение было аналогично 5'-VP.

Пример 6. 5'-VP-модификации и оценка в отношении активности siRNA

Синтез 5'-винилфосфонат-фосфорамидита с пивалооксиметильной защитной группой:

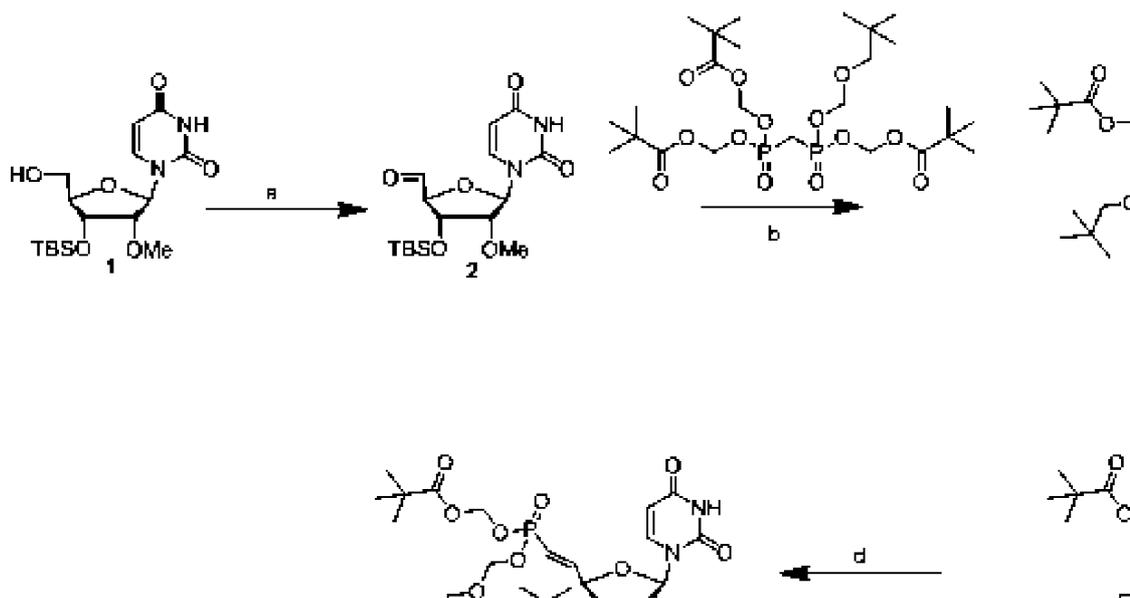
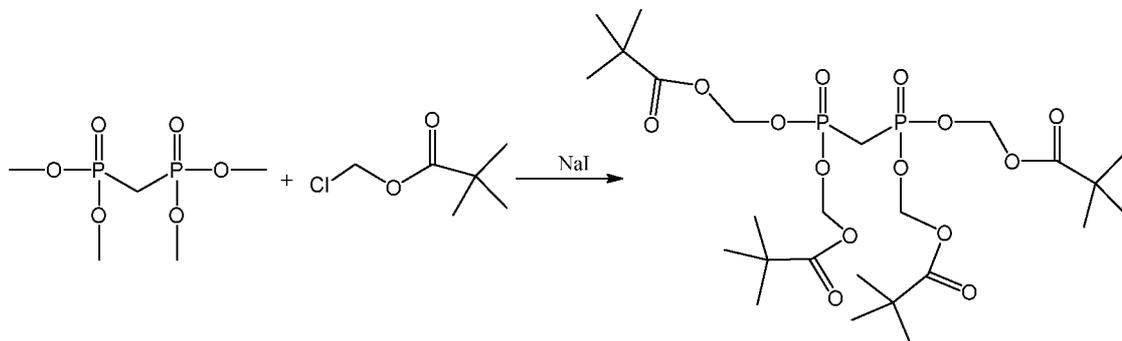


Схема 1

Реагенты и условия реакции для схемы 1: (А) периодинан Десса-Мартина, DCM, 0°C; (b) NaH, тетра (пивалоилоксиметил) бисфосфонат, THF, -78°C, с последующим перемешиванием при 0°C, 70% (Е- и Z-изомеры); (с) муравьиная кислота: вода, 1:1, 24 часа, разделение Е- и Z-изомеров посредством хроматографии на колонке с силикагелем или RP-HPLC (обращенно-фазовой HPLC); (d) 2-цианоэтил N,N,N',N'-

тетраизопропилфосфордиамидит, 5-(этилтио)-1*H*-тетразол, ACN, 6 часов, комнатная температура, 65%.

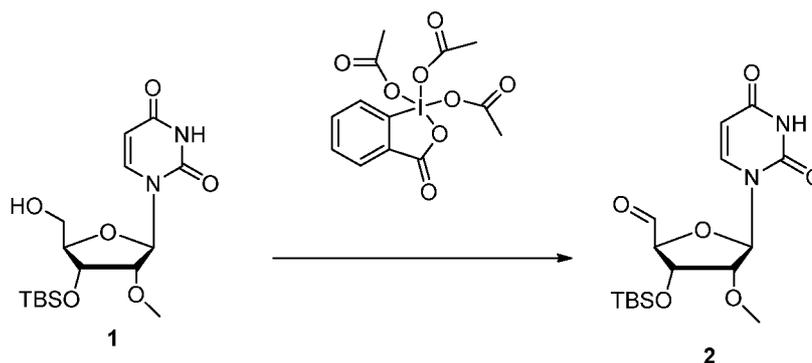
Синтез тетра(пивалоилоксиметил)-бис-фосфоната (X)



Тетраметилметиленбисфосфонат (120 г, 0,51 моль), NaI (308 г, 2 моль), хлорметилпивалат (387 г, 2,5 моль) и ацетонитрил (400 мл) смешивали и нагревали с обратным холодильником в течение ночи. Образование продукта подтверждали путем проведения TLC (тонкослойной хроматографии) в EtOAc с 5% метанола. Реакционную смесь разбавляли простым эфиром (1000 мл) и промывали водой (2 × 1000 мл), высушивали с Na₂SO₃ и выпаривали. Твердый остаток промывали холодным гексаном и сушили в вакууме с получением 148 г (45 %) **X** в виде бледно-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 5,73–5,63 (m, 8H), 2,65 (t, 2H), 1,22 (s, 36H); ³¹P ЯМР (500 МГц, CDCl₃): δ 18,61.

Получение соединения 2

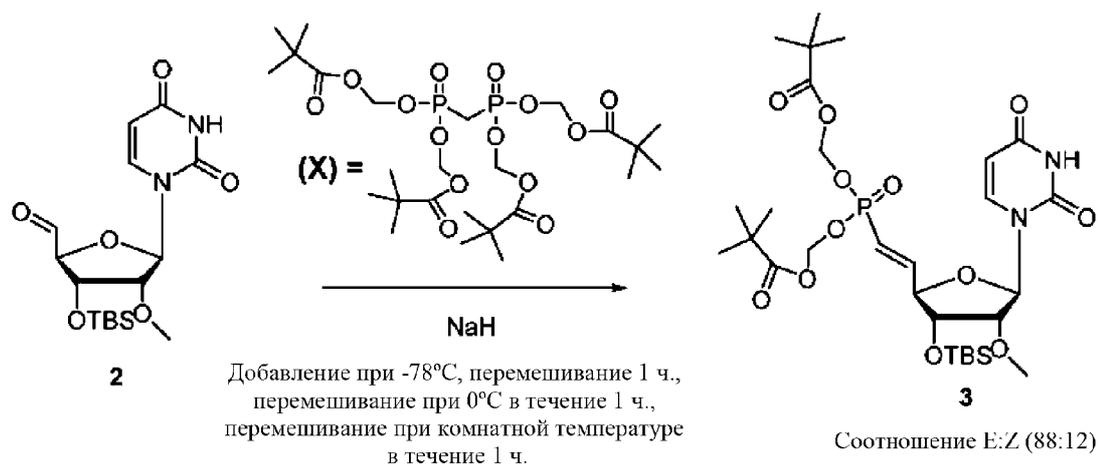


К ледяному раствору соединения **1** (3,0 г, 8 ммоль) в 150 мл безводного дихлорметана добавляли периодинан Десса-Мартина (DMP) (1,4 эквивалента; 4,7 г, 11,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, а затем при комнатной температуре в течение 3 часов. Образование продукта подтверждали путем проведения TLC. Затем реакционную смесь добавляли в 200 мл раствора из 10% Na₂S₂O₃ и насыщенного NaHCO₃ (1:1) с последующим

добавлением 200 мл этилацетата. Неочищенный альдегид экстрагировали в высушенном этилацетате и концентрировали при сниженном давлении. Неочищенный альдегид использовали без какой-либо очистки на следующей стадии.

Выход = 2,87 г (97%); чистота согласно ЯМР составила приблизительно 70%; LC-MS: масса/заряд 371.

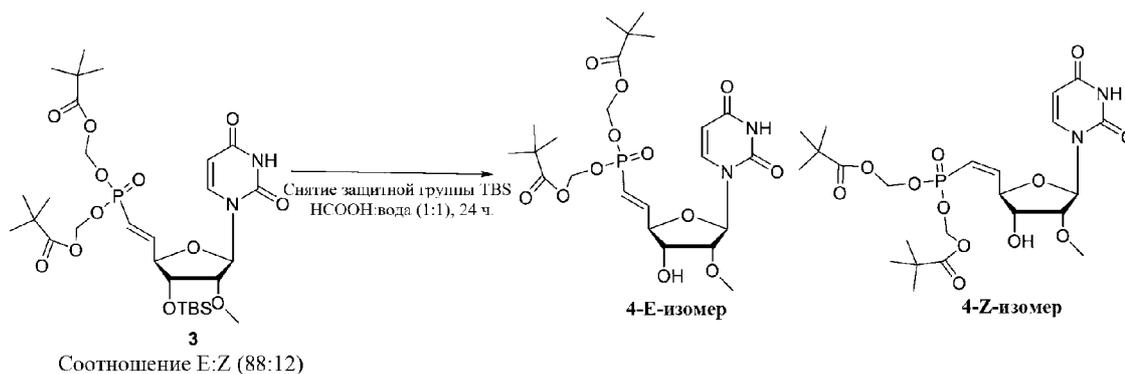
Получение соединения 3



Раствор натриевой соли тетраполиоксометалат (POM) – бисфосфоната получали путем добавления бисфосфоната **(X)** в 14 мл THF (12,6 г, 20 ммоль) в суспензию NaH (0,58 г, 24 ммоль) в 20 мл THF при -78°C и перемешивали в течение 15 минут.

Раствор альдегида **2** (2,86 г) в 40 мл безводного THF по каплям добавляли в полученный выше раствор натриевой соли тетра (POM) бисфосфоната при -78°C . Реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 часа, при 0°C в течение следующего часа, а затем при комнатной температуре в течение одного часа. Образование продукта подтверждали путем проведения TLC (EtOAc: гексан 7:3). Неочищенную реакционную смесь добавляли в 300 мл насыщенного раствора хлорида аммония и экстрагировали с помощью 300 мл этилацетата. Органический слой промывали соевым раствором, сушили над сульфатом натрия. Затем раствор концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали с помощью хроматографии на колонке с силикагелем (EtOAc в гексане = 20-100%) с получением соединения **3** (4,0 г) в виде смеси **E/Z-изомеров** (88/12) с выходом 72%.

Получение соединения 4



Раствор **3** (4 г, 5,7 ммоль) в 200 мл HCOOH/H₂O (1:1, объем:объем) перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Образование продукта подтверждали путем проведения TLC (MeOH: CH₂Cl₂ = 5:95).

Данный раствор концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (MeOH: CH₂Cl₂ = 7:93 объем/объем). Фракции проверяли на RP-HPLC (колонка C18, буфер А= 0,05% ТФА в воде, буфер В = 0,05% ТФА в ACN; градиент 5-95% за 25 минут) для подтверждения чистоты двух изомеров (**Е-** и **Z-изомеры**): Е-изомер элюируется в 14,1 минуты, а Z-изомер элюируется в 14,9 минуты. Первичные фракции, полученные в ходе хроматографии на силикагеле, содержали смесь Е- и Z-изомеров, а остальные фракции содержали Е-изомер. Фракции, содержащие смесь Е- и Z-изомеров, очищали посредством RP-HPLC. Получили **4-Е-изомер** 2,3 г, выход 71%.

Е-изомер:

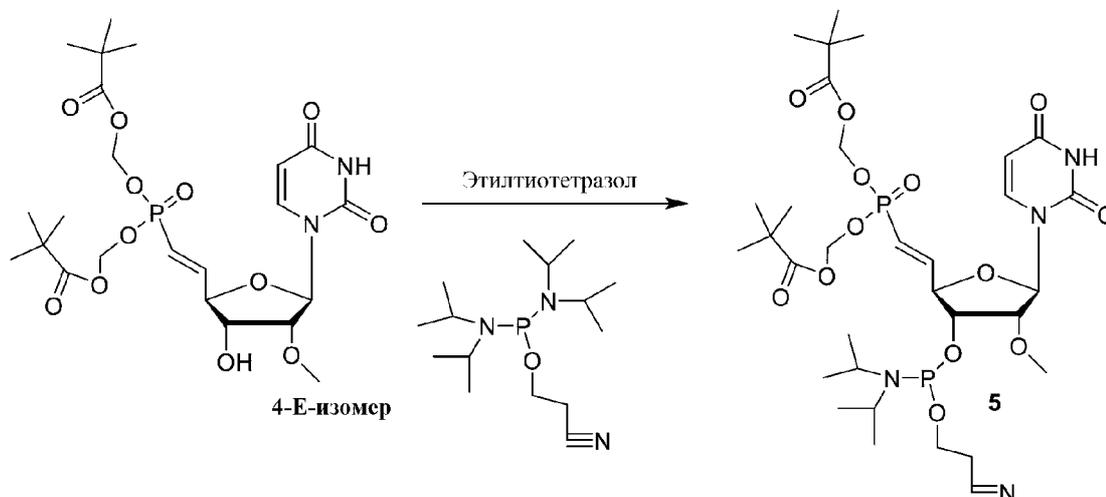
¹H ЯМР (400 МГц, Ацетонитрил-*d*₃): δ 8,98 (s, 1H), 7,30 (d, *J* = 8,1 Гц, 1H), 6,80 (ddd, *J* = 23,7, 17,2, 5,0 Гц, 1H), 6,02 (ddd, *J* = 21,6, 17,1, 1,7 Гц, 1H), 5,77 (d, *J* = 3,2 Гц, 1H), 5,57 (m, 5H), 4,32 (m, 1H), 4,01 (dd, *J* = 7,0, 5,4 Гц, 1H), 3,82 (dd, *J* = 5,5, 3,2 Гц, 1H), 3,41 (s, 3H), 1,14 (d, *J* = 1,5 Гц, 18H); ³¹P ЯМР (162 МГц, Ацетонитрил-*d*₃): δ 18,29.

Z-изомер:

¹H ЯМР (500 МГц, Ацетонитрил-*d*₃): δ 9,50 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 8,1 Гц, 1H), 6,69 (ddd, *J* = 54,4, 13,3, 8,7 Гц, 1H), 5,93 (ddd, *J* = 17,8, 13,3, 1,3 Гц, 1H), 5,80 (d, *J* = 2,9 Гц, 1H), 5,69 – 5,58 (m, 5H), 5,22 (m, 1H), 4,01 (dd, *J* = 7,1, 5,3 Гц,

1H), 3,88 (dd, $J = 5,3, 2,9$ Гц, 1H), 3,49 (s, 3H), 1,19 (d, $J = 5,8$ Гц, 18H); ^{31}P ЯМР (202 МГц, Ацетонитрил- d_3): δ 18,75.

Получение соединения 5



В раствор соединения **4-Е-изомер** (2,1 г, 3,62 ммоль) и этилтиотетразола (0,46 г, 3,62 ммоль) в АСN (40 мл) добавляли 2-цианоэтил N,N,N',N' -тетраизопропилфосфордиамидит (1,311 г, 4,35 ммоль). Данную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Образование продукта подтверждали путем проведения TLC в гексане: EtOAc (2:8 в 0.15 % ТЕА). Реакционную смесь фильтровали, концентрировали и загружали на колонку с силикагелем. Образец элюировали с помощью 20% - 100% EtOAc в гексане с ТЕА (0,15%) с получением соединения **5** в виде белой пены (1,75 г, 62%).

Е-изомер:

^1H ЯМР (400 МГц, Ацетонитрил- d_3): δ 9,09 (s, 1H), 7,38 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 6,89 (m, 1H), 6,10 (dddd, $J = 21,4, 17,1, 2,8, 1,7$ Гц, 1H), 5,86 (t, $J = 3,8$ Гц, 1H), 5,67 - 5,55 (m, 5H), 4,66 - 4,50 (m, 1H), 4,40 - 4,20 (m, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,92 - 3,57 (m, 4H), 3,44 (s, 3H), 2,73 - 2,64 (m, 2H), 2,14 (s, 1H), 1,24 - 1,14 (m, 30H); ^{31}P ЯМР (162 МГц, Ацетонитрил- d_3): δ 151,79 (d, $J = 71,3$ Гц), 18,07 (d, $J = 54,0$ Гц).

Z-изомер:

^1H ЯМР (400 МГц, Ацетонитрил- d_3): δ 9,02 (s, 1H), 7,41 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Гц, 1H), 6,62 (dddd, $J = 53,7, 13,1, 9,7, 7,0$ Гц, 1H), 5,97 (dd, $J = 17,4, 13,1$ Гц, 1H), 5,80 (dd, $J = 7,0, 3,5$ Гц, 1H), 5,70 - 5,52 (m, 5H), 5,41 (m, 1H), 4,40 - 4,10 (m, 1H),

4,06 – 3,98 (m, 1H), 3,93 – 3,56 (m, 4H), 3,47 (s, 3H), 2,68 (m, 2H), 2,14 (s, 1H), 1,33 – 1,11 (m, 30H); ³¹P ЯМР (202 МГц, Ацетонитрил-*d*₃): δ 150,81 (d, *J* = 141,4 Гц), 15,17.

Протоколы для синтеза олигонуклеотидов, содержащих 5'-винилфосфонат

Синтез винилфосфонатных мономеров и 5'-VP-модифицированных олигонуклеотидов проводили аналогично процедурам, описанным в литературе (WO 2008/100447, Chen et al.; Lima et al. "Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals," *Cell* 150: 883-894 (2012); Prakash et al., "Identification of metabolically stable 5-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity," *Nucleic Acids Research* 43: 2993-3011 (2015), которые тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте). Вкратце, 5'-фосфат защищали посредством простого этилового эфира, а затем защищенный простым этиловым эфиром фосфат подвергали двухстадийному снятию защитной группы: 1) TMS-I на твердой подложке в безводных условиях и 2) стандартное снятие защитных групп с олигонуклеотида с получением 5'-VP-модифицированного олигонуклеотида. Данный способ также обсуждается в примере 5.

Эффект метаболически стабильного (E-) и (Z-) 5'-винилфосфона на активность siRNA

Двухнитевая малая интерферирующая РНК (siRNA) с 5'-фосфорилированной антисмысловой нитью способствует эффективному включению в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC) для обеспечения устойчивого сайленсинга генов, опосредованного RNAi. Таким образом, 5'-фосфорилирование синтетических siRNA под действием Clp1-киназы является ключевым для включения в RISC и выбора нити (Weitzer et al., "The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs," *Nature* 447: 222-226 (2007)). Имитации фосфата, обеспечивающие метаболически стабильную связь, были использованы для модификаций нуклеозидов, применяемых в качестве противовирусных средств (WO 2008/100447, Chen et al.), для 5'-концевой модификации siRNA для увеличения активности сайленсинга генов по сравнению с соответствующими нефосфорилированными siRNA, в

частности, однонитевыми siRNA (Lima et al. "Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals," *Cell* 150: 883-894 (2012); Prakash et al., "Identification of metabolically stable 5-phosphate analogs that support single-stranded siRNA activity," *Nucleic Acids Research* 43: 2993-3011 (2015)).

В данном примере эффект имитаций фосфата в двухнитевых siRNA оценивали как *in vitro*, так и *in vivo*.

Последовательности siRNA, использованные в данном примере, показаны в таблицах ниже.

ID дуплекса	Последовательность смысловой нити	Последовательность антисмысловой нити
AD-66572	usgsgaagCfaGfUfAfuguugaugg aL96	usCfscauCfaAfCfauacUfgCf uuccasasa
AD-68365.3	usgsgaagCfaGfUfAfuguugaugg aL96	VPuCfcacuCfaAfCfauacUfgCf uuccasasa
AD-68431.1	usgsgaagCfaGfUfAfuguugaugg aL96	VPuFcfcauCfaAfCfauacUfgC fuuccasasa
AD-68433.1	usgsgaagCfaGfUfAfuguugaugg aL96	VP (Tam) CfcauCfaAfCfauacU fgCfuuccasasa

u = 2'OMe, 5' OH U

Vpu = 2'OMe, 5'VP U

VPuF = 2'F, 5'VP U

VP (Tam) = 2'N-метилацетамид, 5'VP T

Модификация в N1 антисмысловой нити	% нокдауна фактора IX при 1 мг/кг (день 14)
2'OMe, 5' OH U	46
2'OMe, 5'VP U	80
2'F, 5'VP U	83
2'N-methylacetamide, 5'VP T	77

Сравнивали воздействие 5'-винилфосфоната (VP) с E- и Z-геометрической структурой на активность siRNA. Результаты показывают, что *in vivo* эффективность химически модифицированных

siRNA можно увеличить с помощью 5'-транс-(E-)VP, который отлично имитирует природный фосфат, тогда как 5'-цис-(Z-)VP не показал увеличения эффективности, что свидетельствует о том, что Z-изомер неудовлетворительно имитирует природный фосфат.

На фигурах 21A-B показан SAR-анализ сравнения *in vitro* и *in vivo* активности siRNA, нацеленных на ApoB, которые содержат 5'-ОН- и 5'-E-VP-модификацию (на 5'-конце антисмысловой нити). На фигуре 21A показаны результаты *in vitro* трансфекции мышинных 1° гепатоцитов. На фигуре 21B показаны уровни LDL через 3 дня после введения однократной дозы (SC введение дозы). Результаты на фигуре 21B демонстрируют, что siRNA, нацеленные на ApoB, которые были модифицированы с помощью 5'-E-VP, показали увеличенную активность.

На фигуре 22 показаны результаты сравнения *in vitro* эффективности 5'-E-VP-модификации и 5'-Z-VP-модификации у конъюгатов siRNA-GalNAc, нацеленных на mTTR и F9. Результаты получили в результате *in vitro* трансфекции мышинных первичных гепатоцитов. Как показано на фигуре, для конъюгата siRNA, который был модифицирован с помощью 5'-E-VP, показана сохранение или увеличение эффективности, тогда как для конъюгата siRNA, который был модифицирован с помощью 5'-Z-VP, показано снижение эффективности.

На фигуре 23 показаны результаты сравнения *in vivo* активности 5'-E-VP-модификации и 5'-Z-VP-модификации у конъюгата siRNA-GalNAc, нацеленного на F9 (SC введение однократной дозы). Результаты демонстрируют, что конъюгат siRNA, который был модифицирован с помощью 5'-E-VP, демонстрировал увеличенную активность сайленсинга генов по сравнению с 5'-ОН-контролем, тогда как конъюгат siRNA, который был модифицирован с помощью 5'-Z-VP, демонстрировал активность, аналогичную активности 5'-ОН-контроля.

Результаты на данных фигурах показывают, что 5'-фосфорилирование антисмысловой нити является желательным для эффективного сайленсинга генов, опосредованного RNAi. Эффективность химически модифицированных siRNA можно увеличить с помощью 5'-транс-винилфосфоната (5'-E-VP), который отлично

имитирует природный фосфат.

Пример 7. 5'-С-малонил-модификации и оценка в отношении активности siRNA

Синтез и введение 5'-С-малонил-модифицированных нуклеотидов в 5'-конец siRNA.

Общие условия эксперимента. Все чувствительные к влажности реакции проводили в безводных условиях в атмосфере аргона. Флеш-хроматографию проводили в системе Combi Flash от Teledyne ISCO (Линкольн, Небраска) с использованием предварительно набитых колонок с силикагелем ReadySep от Teledyne ISCO. Спектры масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ESI-HRMS) регистрировали на спектрометре Q-ToF API-US от Waters (Милфорд, Массачусетс) с использованием прямого ввода образца в позитивном режиме (напряжение на капилляре = 3000 кВ, конус = 35, источник температуры = 120°C и температура десольватации = 350°C). ¹H и ¹³C ЯМР-спектры регистрировали при комнатной температуре на спектрометрах Varian (Пало Альто, Калифорния) при 400 МГц (¹H) и 126 МГц (¹³C) и химические сдвиги в ppm приведены относительно пиков остаточного растворителя. Константы взаимодействия приведены в герцах. Паттерны расщепления сигналов описаны как синглет (s), дублет (d), триплет (t), квартет (q), широкополосный сигнал (br) или мультиплет (m). ³¹P ЯМР-спектры регистрировали при 162 МГц в режиме подавления спи-спинового взаимодействия с протонами и химические сдвиги приведены относительно внешней H₃PO₄ (80%). LC/ESI-MS проводили в одноквадрупольной системе для LC/MS 6130 от Agilent (Санта Клара, Калифорния) с использованием колонки XBridge C8 (2,1 × 50 мм, 2,5 мкм) при 60°C. Буфер А состоял из 100 мМ 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола (HFIP) и 16,3 мМ триэтиламина (ТЕА) в H₂O, а буфер В представлял собой 100% метанол.

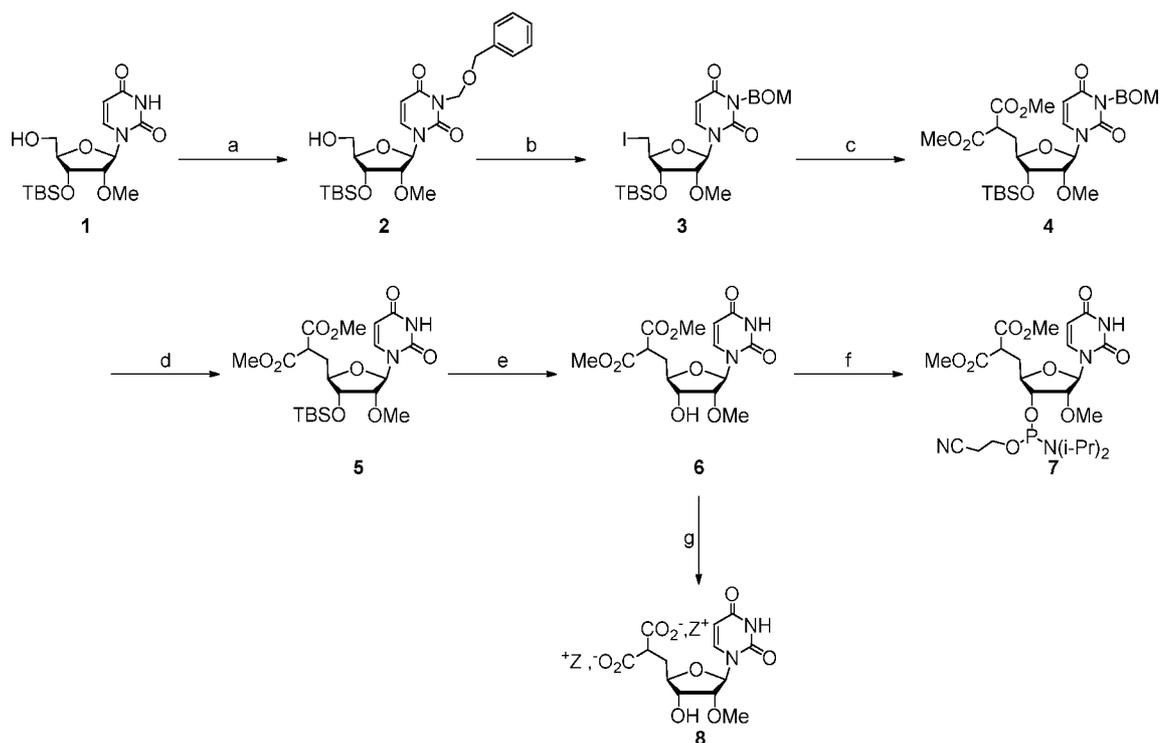


Схема 2

Реагенты и условия для схемы 2: (a) бензилоксиметилацетаталя (BOM) хлорид, DBU, DMF, 30 минут, 0°C, количественный выход (Kurosu et al., "Synthetic studies towards the identification of novel capuramycin analogs with mycobactericidal activity," *Heterocycles* 77: 217-225 (2009); Kurosu et al., "Concise Synthesis of Capuramycin," *Org. Lett.* 11:2393-2396 (2009), каждая из которых включена посредством ссылки во всей своей полноте); (b) метилтрифеноксифосфония йодид, DMF, 15 минут, комнатная температура, 92%; (c) метоксид натрия, диметилмалонат, 1,2-DME, 24 часа, нагревание с обратным холодильником, 92%; (d) 10% Pd/C, атмосфера H₂, i-PrOH/H₂O (10:1, объем/объем), 0,05 эквивалента муравьиной кислоты, 12 часов, комнатная температура, 98% (Alewi et al., "A reliable Pd-mediated hydrogenolytic deprotection of BOM group of uridine ureido nitrogen," *Tetrahedron Lett.* 53: 3758-3762 (2012), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте); (e) NEt₃-3HF, THF, 48 часов, комнатная температура, 88%; (f) 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит, DIEA, DCM, 18 часов, комнатная температура, 56%; (g) 1 М водный раствор пиперидина, 24 часа, комнатная температура; затем смесь 30% водного раствора

аммиака/этанола (3:1, объем/объем), 36 часов, комнатная температура, количественный выход, Z^+ = пиперидиний.

Синтез N^3 -бензилоксиметил-2'-О-метил-3'-О-трет-бутилдиметилсилилуридина (2)

2'-О-метил-3'-О-трет-бутилдиметилсилил-уридин (1, 20 г, 53,7 ммоль) превращали в 2 (26,5 г, количественный выход) согласно варианту процедуры, о которой сообщали ранее.

Синтез N^3 -бензилоксиметил-5'-дезоксид-5'-йодо-2'-О-метил-3'-О-трет-бутилдиметилсилилуридина (3)

Соединение 2 (10 г, 20,3 ммоль) растворяли в 100 мл безводного DMF и добавляли 20 г (40,6 ммоль) метилтрифеноксифосфония йодида. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Метанол (200 мл) добавляли в реакционную смесь и данную смесь перемешивали в течение дополнительных 15 минут. Растворители выпаривали до сухости; остаток растворяли в дихлорметане (DCM) и промывали 5% раствором $Na_2S_2O_3$ с последующей промывкой водой. Органические слои собирали, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и выпаривали до сухости. Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента 0-50% этилацетата (EtOAc) в гексанах, с получением 3 в виде белой пены (11,2 г, 92%).

1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$): δ 7,77 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H), 7,30 (m, 5H), 5,90 (d, $J = 5,2$ Гц, 1H), 5,85 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H), 5,33 (d, $J = 13,0$ Гц, 1H), 5,30 (d, $J = 13,0$ Гц, 1H), 4,58 (s, 2H), 4,23 (t, $J = 4,5$ Гц, 1H), 4,07 (t, $J = 5,1$ Гц, 1H), 3,87 (q, $J = 6,1$ Гц, 1H), 3,55 (dd, $J = 10,6, 6,3$ Гц, 1H), 3,39 (dd, $J = 10,6, 6,3$ Гц, 1H), 3,32 (s, 3H), 0,89 (s, 9H), 0,14 (s, 3H), 0,12 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, $DMSO-d_6$): δ 161,7, 150,7, 140,2, 138,0, 128,2, 127,4, 127,3, 101,6, 87,9, 83,3, 80,8, 72,7, 71,0, 70,1, 57,6, 25,6, 17,7, 6,2, -4,7, -4,8.

HRMS-ESI: расщ. для $C_{24}H_{35}IN_2NaO_6Si$ ($M+Na$)⁺ равняется 625,1207; найденное значение : 625,1205.

Синтез N^3 -бензилоксиметил-5'-дезоксид-5'-С-(диметилмалонил)-2'-О-метил-3'-О-трет-бутилдиметилсилилуридина (4)

Метоксид натрия (2 г, 33 ммоль) помещали в сухую

круглодонную колбу, добавляли диметилмалонат (12 мл, 100 ммоль) и безводный 1,2-диметоксиэтан (DME, 100 мл) и данную смесь нагревали с обратным холодильником. Соединение **3** (10 г, 16,5 ммоль) после двукратного совместного выпаривания с безводным ацетонитрилом растворяли в 70 мл безводного DME и добавляли к раствору диметилмалоната и метоксида натрия, нагреваемым с обратным холодильником. Нагревание с обратным холодильником проводили в течение 24 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли метанол (50 мл) для гашения реакции. Растворители и летучие компоненты выпаривали *in vacuo*. Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента 0-100% EtOAc в гексанах, с получением соединения **4** в виде бесцветного масла (9,2 г, 92%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 7,66 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H), 7,30 (m, 5H), 5,80 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H), 5,76 (d, $J = 4,0$ Гц, 1H), 5,33 (d, $J = 13,4$ Гц, 1H), 5,30 (d, $J = 13,4$ Гц, 1H), 4,58 (s, 2H), 4,14 (t, $J = 5,4$ Гц, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,64 (m, 4H), 3,60 (s, 3H), 3,33 (s, 3H), 2,37 – 2,09 (m, 2H), 0,87 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO- d_6): δ 169,1, 168,8, 161,9, 150,6, 140,4, 138,0, 128,1, 127,4, 127,3, 101,3, 88,6, 88,5, 81,3, 80,9, 73,1, 71,0, 70,0, 59,7, 57,5, 52,5, 48,0, 31,5, 25,6, 17,7, -4,76, -5,06.

HRMS-ESI: расч. для $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_{10}\text{Si}$ (M+Na) $^+$ равняется 629,2506; найденное значение: 629,2508.

Синтез 5'-дезоксидиметилмалонил-2'-О-метил-3'-О-трет-бутилдиметилсилилуридина (**5**)

Соединение **4** (8,7 г, 14,3 ммоль) растворяли в 660 мл смеси изо-пропанол/вода (10:1, объем/объем) и добавляли 0,9 г 10% Pd/C с последующим добавлением 27 мл (0,7 ммоль) муравьиной кислоты. Воздух из колбы удаляли под вакуумом; реакционную колбу продували водородом и перемешивали в атмосфере водорода при нормальном давлении при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакционную смесь фильтровали через целит и промывали этанолом. Фильтраты собирали и выпаривали до сухости. Неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на

силикагеле, используя в качестве элюента 0-5% MeOH в DCM. Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением **5** в виде белой пены (6,7 г, 98%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 11,38 (d, $J = 1,8$ Гц, 1H), 7,61 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 5,71 (d, $J = 4,3$ Гц, 1H), 5,65 (dd, $J = 8,0$ Гц, $J = 2,1$ Гц, 1H), 4,16 (t, $J = 5,3$ Гц, 1H), 3,91 (t, $J = 4,8$ Гц, 1H), 3,73 (m, 1H), 3,63 (m, 4H), 3,61 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 2,24 - 2,07 (m, 2H), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,08 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO- d_6): δ 169,2, 168,9, 163,0, 150,4, 141,2, 141,2, 102,1, 87,7, 81,2, 80,9, 73,1, 57,5, 52,5, 52,4, 52,3, 48,0, 31,6, 25,6, 17,7, -4,8, -5,1.

HRMS-ESI: расщ. для $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Si}$ (M+Na) $^+$ равняется 509,1931; найденное значение: 509,1929.

Синтез 5'-дезоксипентозил-2'-О-метилуридина (6)

Соединение **5** (6,7 г, 13,8 ммоль) перемешивали с триэтиламин-тригидрофторидом (11 мл, 202,5 ммоль) в 150 мл безводного THF в круглодонной колбе при комнатной температуре в течение 48 часов. Растворители выпаривали *in vacuo* до достижения двух третей первоначального объема. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле, используя в качестве элюента 0-10% MeOH в DCM. Соответствующие фракции объединяли и выпаривали до сухости с получением **6** в виде белой пены (4,5 г, 88%).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 11,37 (s, 1H), 7,56 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 5,72 (d, $J = 4,3$ Гц, 1H), 5,64 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 5,24 (d, $J = 6,3$ Гц, 1H), 3,94 (q, $J = 5,7$ Гц, 1H), 3,86 (t, $J = 4,8$ Гц, 1H), 3,72 (m, 1H), 3,64 (m, 4H), 3,61 (m, 3H), 3,34 (s, 3H), 2,25 - 2,07 (m, 2H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO- d_6): δ 169,2, 169,0, 163,0, 150,3, 141,0, 102,0, 87,4, 81,6, 80,8, 71,9, 57,6, 52,5, 52,4, 48,0, 31,9.

HRMS-ESI: расщ. для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_9$ (M+Na) $^+$ равняется 395,1067; найденное значение: 395,1070.

Синтез 5'-дезоксипентозил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил)-N,N-ди-изопропилфосфорамидита (7)

Соединение **6** (3,0 г, 8 ммоль) трижды совместно выпаривали с безводным ацетонитрилом, а затем сушили под вакуумом над P_2O_5 в

течение ночи. Сухой остаток растворяли в 60 мл безводного DCM; последовательно добавляли диизопропилэтиламин (4,5 мл, 24 ммоль) и 2-цианоэтил *N,N*-диизопропилхлорфосфорамидит (2,2 мл, 10,0 ммоль). После 1 часа перемешивания в атмосфере аргона, добавляли еще 1,0 мл (4,0 ммоль) 2-цианоэтил *N,N*-диизопропилхлорфосфорамидита и взбалтывание продолжали в течение дополнительных 18 часов. Реакционную смесь разбавляли 150 мл DCM и промывали 200 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. Органический слой сушили с помощью сульфата натрия и его удаляли посредством фильтрации. Растворители выпаривали *in vacuo* и неочищенный остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле. Элюентом служила смесь гексаны/EtOAc/NEt₃ (от 66:33:1, объем/объем/объем в ступенчатом градиенте до смеси гексаны/EtOAc/NEt₃ 33:66:1, объем/объем/объем). Соответствующие фракции объединяли, выпаривали до сухости, совместно выпаривали с безводным ацетонитрилом и сушили под вакуумом с высокой степенью разрежения с получением **7** в виде белой пены (3,2 г, 56%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃CN, смесь диастереоизомеров): δ 8,97 (s, 1H), 7,36 (m, 1H), 5,78 (d, *J* = 4,2 Гц, 1H), 5,64 (d, *J* = 8,1 Гц, 1H), 4,23 – 3,80 (m, 4H), 3,77 – 3,59 (m, 8H), 3,45 – 3,41 (m, 3H), 2,68 (t, *J* = 5,9 Гц, 2H), 2,44 – 2,31 (m, 2H), 1,42 – 1,00 (m, 12H). ³¹P ЯМР (162 МГц, CD₃CN, смесь диастереоизомеров): δ 151,8, 151,6. ¹³C ЯМР (126 МГц, CD₃CN, смесь диастереоизомеров): δ 170,6, 170,2, 163,8, 151,3, 141,3, 119,6, 103,0, 102,9, 89,6, 89,2, 82,9, 82,5, 82,4, 81,8, 81,3, 81,2, 75,3, 75,2, 75,1, 75,0, 59,8, 59,7, 59,3, 59,1, 58,9, 58,8, 53,3, 53,2, 49,5, 49,4, 44,2, 44,15, 44,1, 44,0, 33,0, 25,0, 24,9, 24,8, 21,0, 20,9.

HRMS-ESI: расщ. для C₂₄H₃₈N₄O₁₀P (M+H)⁺ равняется 573,2326; найденное значение: 573,2321.

Синтез пиперидиниевой соли 5'-дезоксипиперидиний-5'-С-малонил-2'-О-метилуридина (8)

Соединение **6** (0,1 г, 0,3 ммоль) перемешивали с 1 М водным раствором пиперидина (10 мл, 10 ммоль) при комнатной температуре в течение 24 часов. Растворители выпаривали *in vacuo* и остаток

растворяли в смеси 30% аммиака/этанола (3:1, объем/объем) и перемешивали при комнатной температуре в течение 36 часов. Растворители выпаривали *in vacuo* и **8** получали в виде бесцветного масла (количественный выход).

^1H ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 7,75 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H), 5,92 (m, 2H), 4,16 (t, $J = 5,5$ Гц, 1H), 4,06 (t, $J = 4,7$ Гц, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,50 (s, 3H), 3,27 (t, $J = 7,0$ Гц, 1H), 3,17 (t, $J = 5,7$ Гц, 6H), 2,27 – 2,06 (m, 2H), 1,87 – 1,54 (m, 8H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, D_2O): δ 179,5, 179,2, 168,0, 153,0, 142,5, 103,1, 88,5, 83,7, 83,3, 72,7, 58,9, 55,9, 45,3, 34,7, 23,0, 22,2.

HRMS-ESI (M+H)⁺: расщ. для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_9$ равняется 345,0929; найденное значение: 345,0919.

Синтез олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды синтезировали с помощью установки для синтеза ДНК/РНК ABI-394 с использованием модифицированных циклов синтеза на основе циклов, предусмотренных для данного устройства. Раствор 0,25 М 5-(S-этилтио)-1H-тетразола в ацетонитриле использовали в качестве активатора. Фосфорамидиты находились в виде 0,15 М растворов в безводном ацетонитриле. Окислитель представлял собой 0,02М I_2 в смеси THF/пиридин/ H_2O . *N,N*-диметил-*N'*-(3-тиоксо-3H-1,2,4-дитиазол-5-ил)метанимидаид (DDTT), из расчета 0,1 М в пиридине, использовали в качестве сульфидирующего реагента. Детритилирующий реагент представлял собой 3% дихлоруксусную кислоту (DCA) в DCM. В случае 5'-фосфатных соединений химический фосфорилирующий реагент от Glen Research (№ по кат. 10-1902-02) использовали для введения 5'-монофосфата. После завершения автоматизированного синтеза твердую подложку промывали 0,1 М пиперидином в ацетонитриле в течение 10 минут, а затем промывали безводным ацетонитрилом и сушили в атмосфере аргона. Затем олигонуклеотид вручную отделяли от подложки и осуществляли снятие защитных групп с использованием смеси 30% NH_4OH /этанол (3:1, объем/объем) или 40% метиламина (0,5 мл/мкмоль твердой подложки) в течение 6 часов при 55°C или 15 минут при 60°C соответственно. Растворитель собирали посредством фильтрации и подложку промывали с помощью DMSO (1,5 мл/мкмоль твердой подложки).

Осажденные на твердой подложке 5'-С-малонил-олигонуклеотиды вначале обрабатывали с помощью 1 М водного раствора пиперидина (1,5 мл/мкмоль твердой подложки) в течение 24 часов при комнатной температуре, а затем раствор отфильтровывали и выпаривали до сухости. Остаток растворяли в смеси 30% NH₄OH/этанол (3:1, объем/объем, 2 мл/мкмоль твердой подложки) и встряхивали при комнатной температуре в течение 36 часов, а затем выпаривали до сухости. Неочищенные олигонуклеотиды очищали с помощью анионообменной HPLC с использованием линейного градиента от 0,22 М до 0,42 М NaClO₄ в 0,02 М Tris-HCl, pH 8,5/50% (объем) ацетонитрила за 120-150 минут при комнатной температуре. Все одиночные нити очищали до >85% чистоты согласно HPLC (260 нм), а затем их обессоливали посредством эксклюзионной хроматографии с использованием стеклянной колонки AP-2 (20 × 300 мм, Waters), набитой под заказ с помощью Sephadex G25 (GE Healthcare), элюировали с помощью стерильной воды, не содержащей нуклеаз. Гибридизацию для получения siRNA-дуплексов проводили с помощью смешивания эквимольных количеств комплементарных нитей до конечной концентрации, составляющей 20 мкМ, в 1× буфере PBS, pH 7,4, и нагревания на водяной бане при 95°C в течение 5 минут с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры.

Оценка влияния 5'-С-малонил-модификаций на активность сайленсинга генов и стабильность

5'-фосфорилирование двухнитевой РНК желательно для эффективного включения малых интерферирующих РНК (siRNA) в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), что приводит сайленсингу генов, опосредованному RNAi. Эндогенные или экзогенные siRNA обычно легко фосфорилируются под действием цитозольной киназы, при этом, в большинстве случаев, присутствие синтетического 5'-монофосфата не требуется. Однако в некоторых случаях химически модифицированных siRNA метаболически стабильные имитации 5'-фосфата могут приводить к повышенной стабильности, повышенному включению в RISC и более эффективному сайленсингу генов.

В данном примере оценивали эффект, обусловленный 5'-С-малонильным фрагментом, который вводили в виде нуклеотида с

модификацией в 5'-конец антисмысловой нити химически модифицированных siRNA, используя твердофазный синтез. 5'-С-малонил может существовать в виде дианиона при физиологическом показателе pH, аналогично 5'-монофосфатному дианиону. Оценивали активность *in vitro* сайленсинга генов, метаболическую стабильность и включение в RISC у siRNA, содержащих 5'-С-малонильную группу в антисмысловых нитях, и сравнивали с соответствующими 5'-фосфорилированными и нефосфорилированными эквивалентами.

Культура клеток и трансфекция

Первичные мышечные гепатоциты получали от Life Technologies и их культивировали в среде Е по Уильямсу (Williams E Medium) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Трансфекцию проводили путем добавления 4,9 мкл среды Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) на лунку к 5 мкл каждого siRNA-дуплекса при необходимой концентрации в каждой лунке в 384-луночном планшете. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут и 40 мкл полной ростовой среды, содержащей 5000 клеток, добавляли к смеси, содержащей siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед выделением РНК. Аналогичной процедуры придерживались при трансфекции 10000000 клеток. Эксперименты для определения эффекта дозы выполняли с использованием восьми 6-кратных серийных разведений в диапазоне от 20 нМ до 75 пМ или от 50 нМ до 187,5 пМ.

Выделение РНК

РНК выделяли с использованием набора для выделения мРНК Dynabeads (Invitrogen). Клетки лизировали в 75 мкл лизирующего/связывающего буфера, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и смешивали в течение 10 минут на электростатическом встряхивателе. Буферы готовили в соответствии с протоколом производителя. Стадии отмывки проводили в автоматическом режиме с помощью Biotek EL406, используя магнитный держатель для планшетов. Гранулы однократно промывали (90 мкл) буфером А, однократно буфером В и двукратно буфером Е со стадиями аспирации между промывками.

Синтез кДНК

Синтез кДНК осуществляли с использованием набора High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). В каждую лунку добавляли смесь из 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКаз и 6,6 мкл воды на одну реакцию. Планшеты герметично закрывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом встряхивателе, а затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80°C в течение 8 минут.

ПЦР в режиме реального времени

кДНК (2 мкл) добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH мыши (Applied Biosystems, № по кат. 4308313), 0,5 мкл зонда TaqMan для *ApoB* или *PTEN* мыши (Applied Biosystems, № по кат. Mm01545156_m1 и Mm01212532_m1 соответственно) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche) на лунку в 50-ти 384-луночных планшетах (Roche). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе ABI 7900HT RT-PCR (Roche) с использованием $\Delta\Delta C_t$ (RQ)-анализа. Каждый дуплекс и концентрацию проверяли в четырех биологических повторностях. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ неспецифической siRNA. Значения IC_{50} рассчитывали с помощью модели подбора по 4 параметрам с использованием XLFit.

Таблица 10. Значения IC_{50} для siRNA с 5'-С-малонилом, 5'-фосфатом и 5'-ОН в клеточных анализах сайленсинга *PTEN* и *ApoB*.

Мишень для мiРНК	5'-модификация	Смысловая нить (5'-3') ^a	Антисмысловая нить (5'-3') ^a	IC_{50} (нМ) ^b
1 <i>ApoB</i>	ОН	C•c•UgGaCaUUCaGaAcAaGaaGalNAc	u•U•cUuGuUcUgaaUgUcCaGg•g•u	1,0
2 <i>ApoB</i>	фосфат	C•c•UgGaCaUUCaGaAcAaGaaGalNAc	Pu•U•cUuGuUcUgaaUgUcCaGg•g•u	0,1
3 <i>ApoB</i>	ОН	U•g•UgAcAaAUuGgGcAuCaAGalNAc	u•U•gAuGcCcAuauUuGuCaCa•a•a	0,5
4 <i>ApoB</i>	фосфат	U•g•UgAcAaAUuGgGcAuCaAGalNAc	Pu•U•gAuGcCcAuauUuGuCaCa•a•a	0,1
5 <i>ApoB</i>	малонат	C•c•UgGaCaUUCaGaAcAaGaaGalNAc	Mu•U•cUuGuUcUgaaUgUcCaGg•g•u	0,7

6 ApoB	малонат	<i>U•g•UgAcAaAUuGgGcAuCaA GalNAc</i>	Mu•U•gAuGcCcAuauUuGuCaCa• a	0,4
7 PTEN	ОН	<i>AaGuAaGgAcCaGaGaCaAdT•d T</i>	uUgUcUcUgGuCcUuAcUudT•dT	0,7
8 PTEN	фосфат	<i>AaGuAaGgAcCaGaGaCaAdT•d T</i>	PuUgUcUcUgGuCcUuAcUudT•dT	0,2
9 PTEN	малонат	<i>AaGuAaGgAcCaGaGaCaAdT•d T</i>	MuUgUcUcUgGuCcUuAcUudT•dT	0,2

Примечание:

^a **P** означает 5'-монофосфат; **M** означает 5'-малонат (т. е. 5'-С-малонил); курсивные буквы верхнего регистра и стандартные буквы нижнего регистра означают 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F)- и 2'-О-метил (2'-ОMe)-модификации сахаров соответственно; • означает фосфоротиоатную (PS) связь; dT означает 2'-дезокситимидиновый нуклеотид; GalNAc означает гидроксипролильный трехвалентный N-ацетил-галактозаминный лиганд (Nair et al., "Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing," *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16958-16961 (2014), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте).

^b означает полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) для сайленсинга генов в первичных мышечных гепатоцитах. Все значения получены в результате проведения экспериментов в трех повторностях.

Анализ стабильности с использованием тритосом

Тритосомы из печени крыс (Xenotech, продукт по специальному заказу PR14044) оттаивали до комнатной температуры и разбавляли до концентрации 0,5 единиц/мл в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 5,0. Образцы готовили путем смешивания 100 мкл кислой фосфатазы тритосом из расчета 0,5 единиц/мл с 25 мкл siRNA из расчета 0,4 мг/мл в микроцентрифужной пробирке. После инкубации в течение 4 часов или 24 часов в Eppendorf Thermomixer, установленной на 37°C, и при 300 об./мин. в каждую лунку добавляли 300 мкл буфера Phenomenex Lysis Loading Buffer и 12,5 мкл внутреннего стандарта siRNA из расчета 0,4 мг/мл. Образцы для момента времени 0 готовили путем смешивания 100 мкл кислой фосфатазы тритосом из расчета 0,5 единиц/мл с 25 мкл образца siRNA из расчета 0,4 мг/мл, 300 мкл Phenomenex Lysis Loading

Buffer и 12,5 мкл внутренней стандартной siRNA из расчета 0,4 мг/мл. siRNA экстрагировали из образца для каждого момента времени (0 часов, 4 часа, 24 часа), используя набор Phenomenex Clarity OTX Starter Kit. Затем образцы ресуспендировали с помощью 500 мкл воды, не содержащей нуклеаз, и 50 мкл образца анализировали с помощью LC/MS.

Иммунопреципитация RISC и RT-PCR анализ

Первичные мышечные гепатоциты (10000000 клеток), трансфицированные siRNA, лизировали в лизирующем буфере (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS) с ингибитором протеаз (Sigma-Aldrich). Концентрацию лизата измеряли с использованием набора для определения белка BCA (Thermo Scientific). Для каждой реакции использовали 2 мг общего лизата. Антитело к Ago2 приобретали у Wako Chemicals (№ клона: 2D4). Контрольный мышечный IgG приобретали у Santa Cruz Biotechnology (sc-2025). Dynabeads (Life Technologies) использовали для преципитации антител. Ago2-ассоциированную siRNA и эндогенную miR122 измеряли с помощью Stem-Loop RT с последующим ПЦР-анализом TaqMan на основе ранее опубликованных способов.

Компьютерное моделирование взаимодействия между 5'-дезоксидином и MID-доменом человеческого Ago2

Режимы распознавания доступных кристаллических структур у комплексов, образованных между MID hAgo2 (аминокислоты 432-578; остатки 440-572 разделяли по электронной плотности) и UMP (PDB ID код 3LUJ) и полноразмерным hAgo2 и miR-20a (PDB ID код 4F3T) выявили, что распознавание 5'-концевых фосфатов было весьма схожим. Единственное различие между этими двумя структурами состоит в том, что в комплексе с полноразмерным Ago2 остаток домена PIWI (Arg-812) способствует распознаванию 5'-фосфата. Таким образом, комплекс UMP:MID использовали за основу моделирования взаимодействия между 5'-малонилюридином и MID-доменом hAgo2. Трехмерные координаты комплекса UMP:MID получили из базы данных Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). С использованием программы UCSF Chimera (версии 1.5.3) из кристаллической структуры удаляли все молекулы воды, а 5'-фосфатную группу превращали в 5'-С-малонильный фрагмент. Затем

добавляли атомы водорода и геометрическую структуру 5'-дезоксиди-5'-С-малонилуридина и его пространственную ориентацию, а также образование Н-связей/взаимодействия без образования связей в 5'-фосфатном кармане MID-домена hAgo2 оптимизировали с помощью силового поля Amber (ff12SB и заряды по Гастейгеру для стандартных аминокислот и нестандартных аминокислотных остатков соответственно), как реализовано в UCSF Chimera.

На фигурах 24А-С представлены графики, показывающие эффект дозы siRNA, нацеленных на *PTEN*, с (А) 5'-ОН, (В) 5'-С-малонилом и (С) 5'-фосфатом на первичных мышечных гепатоцитах в анализе *in vitro* сайленсинга *PTEN*. Все значения получены в результате проведения экспериментов в трех повторностях.

На фигуре 25 показаны результаты устойчивости к ферментам у siRNA с 5'-ОН, 5'-С-малонилом и 5'-фосфатом, которые инкубировали с тритосомами печени крыс. Целевые последовательности для siRNA показаны в таблице 10. siRNA инкубировали из расчета 0,4 мг/мл (приблизительно 5 нМ) в течение 4 часов и 24 часов соответственно в присутствии тритосом. Процент полноразмерных нитей определяли с помощью HPLC. Данные нормализовали относительно необработанных контролей.

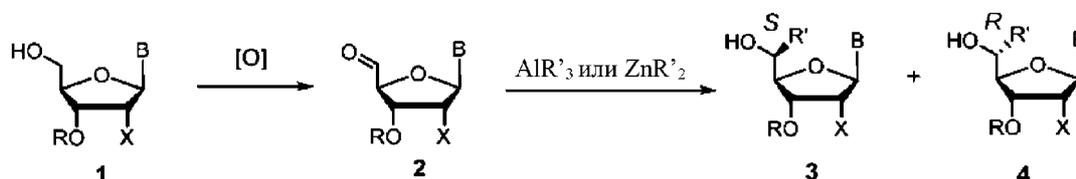
На фигуре 26 показаны результаты включения в RISC siRNA с 5'-ОН, 5'-С-малонилом и 5'-фосфатом (5'-модификация в антисмысловых нитях), как определено по иммунопреципитации Ago2 из первичных мышечных гепатоцитов и путем амплификации с помощью RT-PCR одиночных нитей, включенных в Ago2. Уровни эндогенных miR122 определяли в качестве контроля. Целевые последовательности для siRNA показаны в таблице 10. siRNA 7, 8 и 9 трансфицировали в клетки при концентрации 10 нМ. Уровни антисмысловых нитей представлены в нМ нитей siRNA на мг клеточного лизата.

Результаты на данных фигурах показывают, что siRNA с 5'-С-малонилом сохраняют или увеличивают *in vitro* сайленсинг генов, высокие уровни включения в Ago2 и обеспечивают существенно улучшенную метаболическую стабильность антисмысловой нити из siRNA-дуплексов по сравнению с соответствующими 5'-фосфорилированными и нефосфорилированными эквивалентами.

Исследования с моделированием *in silico* показали положительное соответствие 5'-С-малонильной группы в пределах 5'-фосфат-связывающего кармана в MID hAgo2. Следовательно, 5'-С-малонил, метаболически стабильный биоизомер 5'-фосфата, характеризуется превосходными свойствами биоимитатора для применения siRNA в терапевтических целях.

Пример 8. Способ стереоселективного синтеза 5'-С-алкилнуклеозидов с использованием триалкилалюминия и диалкилцинка

Общая схема синтеза 5'-С-алкилнуклеозидов путем присоединения слабых алкильных нуклеофилов к альдегидам 5'-нуклеозидов



R = TBS, любая защитная группа или любой заместитель

X = H, F, OMe, OMOE, ONMA, OPGA (PG – любая защитная группа), OR" (R" – любая алкильная группа)

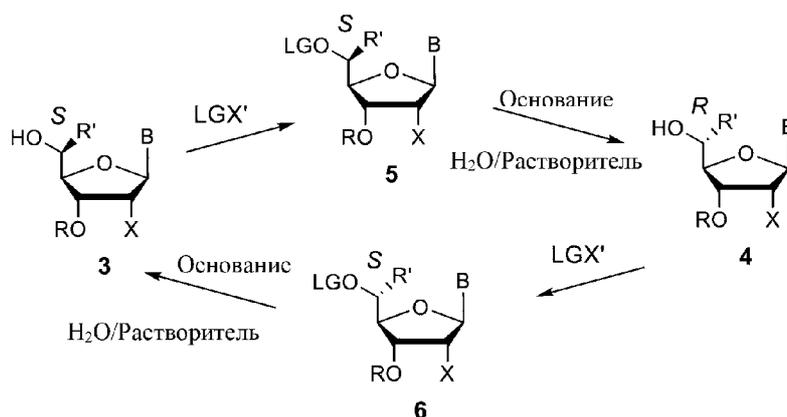
B = незащищенный или защищенный U, T, C, A, G или любое модифицированное нуклеиновое основание

R' = Me или любой алкильный заместитель

В качестве альтернативы вместо AlR'_3 или ZnR'_2 (показаны выше на схеме 2) можно использовать SnR'_4 , TiR'_4 и другие различные металлы, кроме Li и Mg, с R'-группой в данной схеме реакции.

Схема 3

Общая схема стереоспецифического взаимопревращения эпимеров 5'-алкилнуклеозидов посредством замыкания ангидрокольца



R = TBS, любая защитная группа или любой заместитель

X = H, F, OH, OMe, OMOF, ONMA, OPGA (PG – любая защитная группа), OR'' (R'' – любая алкильная группа)

B = незащищенный или защищенный U, T, C или любое модифицированное пиримидиновое нуклеиновое основание

R' = Me или любой алкильный заместитель

LG = OMs, OTs или любая подходящая уходящая группа

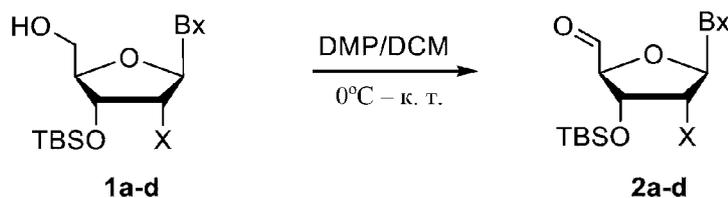
LGX' = MsCl, TsCl или любой хлорангидрид или ангидрид сильной кислоты

Основание = DBU или любой основной реагент

Растворитель = THF, диоксан или любой смешиваемый с водой органический растворитель

Схема 4

Синтез пиримидин-5'-альдегидов 2a-d с использованием периодинана Десса-Мартина



(1-2)a: Bx = U, X = OMe

(1-2)b: Bx = U, X = F

(1-2)c: Bx = T, X = H

(1-2)d: Bx = C^{Ac}, X = OMe

93-99%;

Содержание альдегида: 60-70%

5'-дезоксидезокси-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-O-метил-5'-оксо-уридин 2a. Периодинан Десса-Мартина (40,7 г, 96 ммоль) добавляли к перемешиваемому и охлажденному (0°C) раствору защищенного с помощью 3'-OTBS уридина **1a** (29,8 г, 80 ммоль) в безводном DCM (600 мл) в атмосфере аргона. Охлаждающую баню удаляли и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, после чего при TLC присутствие исходного спирта **1a** нельзя было обнаружить. Смесь охлаждали до 0°C и выливали в интенсивно перемешиваемую смесь 10% раствора тиосульфата натрия (250 мл) и насыщенного раствора бикарбоната натрия (350 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 45 минут

наблюдалось выраженное выпадение осадка. Осадок отфильтровывали и твердое вещество промывали с помощью DCM (200 мл x 2). Фильтрат помещали в разделительную воронку, органическую фазу отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. Твердое вещество из фильтровальной воронки переносили в колбу Эрленмейера, добавляли ацетон (450 мл), суспензию перемешивали в течение 15 минут, фильтровали и твердое вещество промывали ацетоном (200 мл x 2). Ацетоновый экстракт выпаривали, остаток объединяли с экстрактом, полученным с помощью DCM, растворитель выпаривали, остаток растворяли в смеси ACN-ацетон 1: 1 (200 мл), растворитель снова выпаривали и твердый остаток сушили в вакууме с получением неочищенного альдегида **2a** 27,6 г (93%). Содержание альдегида составляло приблизительно 71% (как определено по соотношению CHO/NH, определенному с помощью ^1H ЯМР в ACN- d_3), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Продукт может храниться без заметного разложения при -20°C в атмосфере аргона. ^1H ЯМР основного компонента

(400 МГц, ACN- d_3): δ 0,15 (s, 6H); 0,93 (s, 9H); 3,37 (s, 3H); 3,62-3,68 (m, 2H); 3,81 (dd, $J = 4,6, 5,9$ Гц, 1H); 4,48 (d, $J = 3,4$ Гц, 1H); 4,59 (ddd, $J = 0,4, 3,4, 4,5$ Гц, 1H); 5,70 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H); 5,94 (d, $J = 6,0$ Гц, 1H); 7,71 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H); 9,17 (bs, 1H); 9,68 (d, $J = 0,5$ Гц, 1H).

2',5'-дидезокси-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-фтор-5'-оксо-уридин 2b получали аналогично из **1b** (13,8 г, 38 ммоль) и DMP (19,5 г, 46 ммоль) в безводном DCM (550 мл). После перемешивания в течение ночи при комнатной температуре смесь охлаждали, гасили и экстрагировали с помощью DCM с получением 12,7 г (93%) неочищенного альдегида, содержащего приблизительно 60% продукта **2b**, обозначенного в заголовке. ^1H ЯМР основного компонента

(400 МГц, ACN- d_3): δ 0,13 (s, 3H); 0,14 (s, 3H); 0,92 (s, 9H); 4,41 (d, $J = 6,0$ Гц, 1H); 4,67 (ddd, $J = 4,9, 6,0, 13,6$ Гц, 1H); 5,15 (ddd, $J = 2,8, 4,9, 52,5$ Гц, 1H); 5,68 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 5,89 (dd, $J = 2,8, 18,3$ Гц, 1H); 7,55 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 9,26 (bs, 1H); 9,64 (d, $J = 1,0$ Гц, 1H).

5'-дезокси-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-5'-оксо-

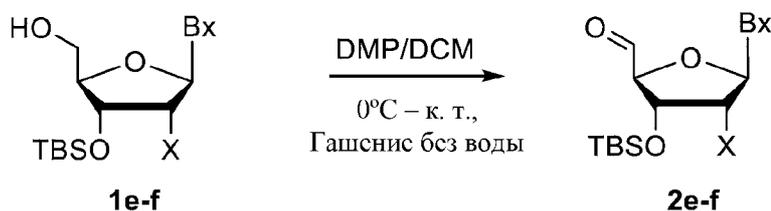
тимидин 2с получали аналогично из **1с** (17,9 г, 50 ммоль) и DMP (25,4 г, 60 ммоль) в безводном DCM (500 мл). После перемешивания в течение 3 часов при 0°C смесь гасили и экстрагировали с помощью DCM с получением 20,0 г (количественный выход) неочищенного альдегида, содержащего примерно 63% продукта **2с**, обозначенного в заголовке. ¹H ЯМР основного компонента

(400 МГц, ACN-d₃): δ 0,135 (s, 3H); 0,140 (s, 3H); 0,92 (s, 9H); 1,85 (d, J = 1,2 Гц, 3H); 2,08-2,24 (m, 2H); 4,38 (d, J = 2,2 Гц, 1H); 4,75 (dt, J = 2,2, 5,7 Гц, 1H); 6,24 (dd, J = 6,2, 7,9 Гц, 1H); 7,55 (d, J = 1,3 Гц, 1H); 9,18 (bs, 1H); 9,65 (d, J = 0,5 Гц, 1H).

N-ацетил-5'-дезоксигуанозин-3'-О-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-О-метил-5'-оксоцитидин **2d** получали аналогично из **1d** (33,1 г, 80 ммоль) и DMP (40,7 г, 96 ммоль) в безводном DCM (600 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов смесь гасили и подвергали обработке аналогично **2a** с получением 33,2 г (100%) неочищенного альдегида, содержащего примерно 56% продукта **2d**, обозначенного в заголовке. ¹H ЯМР основного компонента

(400 МГц, ACN-d₃): δ 0,108 (s, 3H); 0,117 (s, 3H); 0,92 (s, 9H); 2,14 (s, 3H); 3,44 (s, 3H); 3,90-3,94 (m, 1H); 4,49-4,52 (m, 2H); 5,92 (d, J = 3,8 Гц, 1H); 7,33 (d, J = 7,5 Гц, 1H); 8,10 (d, J = 7,5 Гц, 1H); 9,13 (bs, 1H); 9,72 (s, 1H).

Синтез пуриновых 5'-альдегидов **2e-f** с использованием периодинана Десса-Мартина, "безводное гашение"



(1-2)e: Bx = A^{Bz}, X = OMe

(1-2)f: Bx = G^{i-Bu}, X = OMe

Количественный выход;
содержание альдегида: 50-55%

N-бензоил-5'-дезоксигуанозин-3'-О-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-О-метил-5'-оксоаденозин **2e**. Периодинан Десса-Мартина (20,4 г, 48 ммоль) добавляли к перемешиваемому и охлажденному (0°C) раствору защищенного с помощью 3'-OTBS аденозина **1e** (20,0 г, 40 ммоль) в безводном DCM (300 мл) в атмосфере аргона. Охлаждающую

баню удаляли и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, после чего при TLC присутствие исходного спирта **1e** нельзя было обнаружить. Добавляли изопропиловый спирт (0,61 мл, 8 ммоль) и перемешивание продолжали в течение дополнительного 1 часа. Растворитель удаляли в вакууме и добавляли этилацетат (220 мл) с последующим медленным добавлением гексанов (150 мл) в течение 4 часов при перемешивании. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали и твердое вещество дважды промывали смесью этилацетат-гексаны (1: 1). Фильтрат выпаривали в вакууме и остаток совместно выпаривали с сухим ацетонитрилом (300 мл). Добавляли ацетонитрил (100 мл) с образованием суспензии, которую перемешивали в течение ночи, фильтровали и твердые вещества дважды промывали ацетонитрилом. Фильтрат выпаривали в вакууме с получением белого пенистого остатка, который высушивали под вакуумом с высокой степенью разрежения с получением 20,2 г (100%) неочищенного альдегида, содержащего примерно 54% продукта **2e**, обозначенного в заголовке, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР основного компонента

(400 МГц, ACN-d_3): δ 0,188 (s, 3H); 0,190 (s, 3H); 0,97 (s, 9H); 3,34 (s, 3H); 4,49 (dd, $J = 4,3, 6,3$ Гц, 1H); 4,51 (dd, $J = 1,0, 2,9$ Гц, 1H); 4,90 (dd, $J = 3,0, 4,2$ Гц, 1H); 6,24 (d, $J = 6,3$ Гц, 1H); 7,54 (t, $J = 7,3$ Гц, 2H); 7,61-7,67 (m, 1H); 7,97-8,03 (m, 2H); 8,44 (s, 1H); 8,66 (s, 1H); 9,50 (bs, 1H); 9,82 (d, $J = 1,0$ Гц, 1H).

N-изобутирил-5'-дезоксиз-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-O-метил-5'-оксо-гуанозин 2f получали аналогично из **1f** (19,3 г, 40 ммоль) и DMP (20,4 г, 48 ммоль) в безводном DCM (300 мл). После перемешивания в течение 3 часов при комнатной температуре добавляли изопропиловый спирт (0,61 мл, 8 ммоль) и перемешивание продолжали в течение дополнительного 1 часа. Растворитель удаляли в вакууме и добавляли этилацетат (225 мл) с последующим медленным добавлением гексанов (150 мл) в течение 30 минут при перемешивании. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов, фильтровали и твердое вещество дважды промывали

смесью этилацетат-гексаны (1: 1,5). Фильтрат выпаривали в вакууме и остаток совместно выпаривали со смесью толуола (250 мл) и сухого ацетонитрила (250 мл), а затем с ацетонитрилом (250 мл). Белый пенистый остаток сушили в вакууме с высокой степенью разрежения с получением 21,5 г неочищенного альдегида, содержащего приблизительно 53% продукта **2f**, обозначенного в заголовке, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР основного компонента

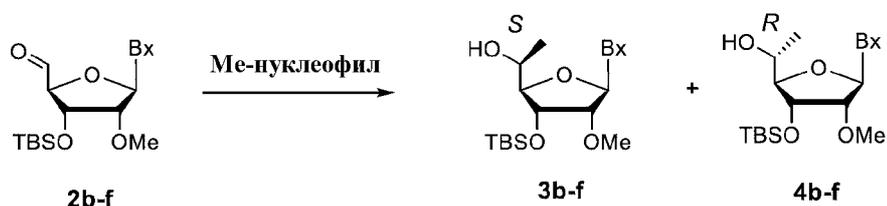
(400 МГц, ACN-d_3): δ 0,167 (s, 3H); 0,175 (s, 3H); 0,95 (s, 9H); 1,18 (d, $J = 6,8$ Гц, 3H); 1,19 (d, $J = 6,8$ Гц, 3H); 2,66-2,77 (m, 1H); 3,31 (s, 3H); 4,31 (dd, $J = 4,3, 7,0$ Гц, 1H); 4,48 (dd, $J = 1,0, 2,3$ Гц, 1H); 4,69 (ddd, $J = 0,4, 2,4, 4,3$ Гц, 1H); 6,01 (d, $J = 7,0$ Гц, 1H); 8,03 (s, 1H); 9,45 (s, 1H); 9,79 (d, $J = 1,1$ Гц, 1H); 12,05 (bs, 1H).

Стереоселективное присоединение слабых Me-нуклеофилов к нуклеозид-5'-альдегидам.

а. Общие замечания

Стереоселективность, обусловленная нуклеиновыми основаниями.

В таблицах ниже показано, что (*S*)-эпимеры 5'-Me-пиримидиновых нуклеозидов можно синтезировать с высоким уровнем стереоселективности, используя триметилалюминий (как показано в таблице для AlMe_3), тогда как (*S*)-эпимеры 5'-Me-пуринов можно синтезировать стереоселективно, используя диметилцинк (как показано в таблице для ZnMe_2).



2b: B = U

2d: B = C^{Ac}

2e: B = A^{Bz}

2f: B = G^{t-Bu}



(S:R)

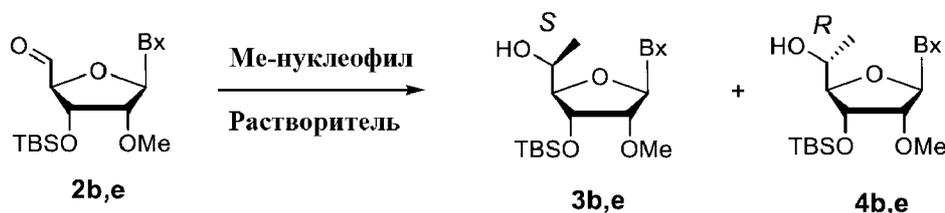
Растворитель/Т (°С)	U	C ^{Ac}	A ^{Bz}	G ^{I-Bu}
THF (от 0 до к. т.)	12:1	9:1	1:1	Медленно 1:2
DCM (от -78 до к. т.)	3,9:1		2:1	1:1
Толуол (от -78 до к. т.)	3,4:1		3:1	



(S:R)

Растворитель/Т (°С)	U	C ^{Ac}	A ^{Bz}	G ^{I-Bu}
THF (от 0 до к. т.)	NR		Медленно 2:1	
DCM/Толуол (от -78 до к. т.)	Очень медленно		9:1	3:1

Стереоселективность, обусловленная растворителем. В таблицах показано, что (S)-эпимеры 5'-Me-пиримидиновых нуклеозидов можно синтезировать с высоким уровнем стереоселективности, используя триметилалюминий в THF (как показано в таблицах для AlMe₃), тогда как (S)-эпимеры 5'-Me-пуринов можно синтезировать стереоселективно, используя диметилцинк в растворителе, не образующем координационных связей (что показано в таблицах для ZnMe₂). Эквимольную смесь пуриновых стереоизомеров можно получить с помощью триметилалюминия, находящегося или в THF (для А-производных), или в растворителе, не образующем координационных связей (DCM) (для G-производных).



2b: Bx = U

2e: Bx = A^{Bz}

AlMe₃

(S:R)

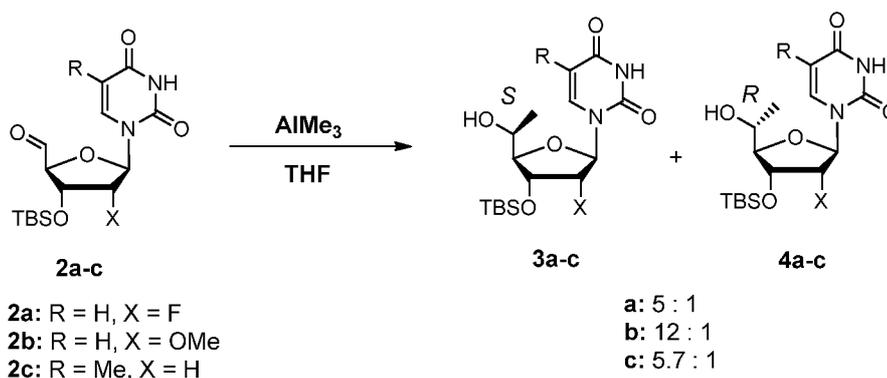
Растворитель/Т (°С)	A ^{Bz}	U	Диэлектрическая постоянная (ε)
Толуол (от -78 до к. т.)	3:1	3,4:1	2,38
DCM (от -78 до к. т.)	2:1	3,9:1	8,93
Диоксан	1,9:1		2,25
Простой эфир	1,6:1		4,33
THF (от 0 до к. т.)	1:1	12:1	7,58

ZnMe₂

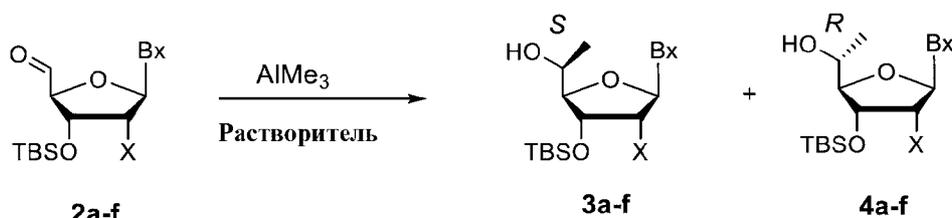
(S:R)

Растворитель/Т (°С)	U	A ^{Bz}
THF (от 0 до к. т.)	NR	Медленно 2:1
DCM/Толуол (от -78 до к. т.)	Очень медленно	9:1

Зависимость стереоселективности от 2'-замещения: образующий координационные связи и более объемный 2'-OMe-заместитель обеспечивал лучшую селективность, чем более маленькие, не образующие координационных связей 2'-F или 2'-H.



в. Порядок осуществления реакции 5'-оксо-нуклеозидов с триметилалюминием.



2a: Bx = U, X = OMe

2b: Bx = U, X = F

2c: Bx = T, X = H

2d: Bx = C^{Ac}, X = OMe

2e: Bx = A^{Bz}, X = OMe

2f: B = G^{i-Bu}, X = OMe

5'-(*S*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-уридин **3a** и 5'-(*R*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-уридин **4a**. Раствор неочищенного альдегида **2a**, содержащий приблизительно 68% обозначенного соединения (25,3 г, \leq 68 ммоль) в безводном THF (200 мл), медленно добавляли через трубочку в течение приблизительно 15 минут в перемешиваемую и охлажденную (0°C) смесь AlMe₃ (2 М в гептане, 102 мл, 204 ммоль) и безводного THF (200 мл) в атмосфере аргона. Охлаждающую баню удаляли, смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 17 часов, охлаждали до 0°C и реакцию гасили путем осторожного добавления 500 мл смеси 1:1 насыщенного водного раствора хлорида аммония и 20% фосфорной кислоты с последующим добавлением 400 мл этилацетата. Органическую фазу отделяли, дважды промывали насыщенным солевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляли в вакууме с получением 25,6 г неочищенного остатка. После проведения колоночной флеш-хроматографии остатка на колонке CombiFlash с 330 г силикагеля в градиенте (от 50 до 90%) этилацетата, содержащего 1% триэтиламина в гексанах, получали **3a** (17,5 г, 67%) и смесь **3a** и **4a** (1,25 г, 5%). Последнюю растворяли в 15 мл горячего этилацетата с последующим медленным добавлением 15 мл гексанов. Смесь оставляли охладиться до комнатной температуры, перемешивали в течение ночи, осадок фильтровали, промывали смесью этилацетат-гексаны 1:2 и сушили с получением чистого соединения **4a** (0,81 г, 65% по кристаллизации, 3% по реакции).

3a: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 0,08 (s, 6H); 0,87 (s, 9H); 1,14 (d, $J = 6,7$ Гц, 3H); 3,33 (s, 3H); 3,68 (dd, $J = 1,8, 4,4$ Гц, 1H); 3,76-3,84 (m, 2H); 4,27 (t, $J = 4,6$ Гц, 1H, $\text{H}2'$); 5,17 (d, $J = 4,4$ Гц, 1H, OH); 5,65 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 5,83 (d, $J = 4,7$ Гц, 1H, $\text{H}1'$); 8,05 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 11,3 (s, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ -4,95; -4,82; 17,78; 20,05; 25,61; 57,56; 64,73; 70,57; 82,61; 85,83; 87,96; 101,79; 140,19; 150,48; 163,08. HRMS масса/заряд расщ. для $[\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si} + \text{H}]^+$: 387,1951; найденное значение: 387,1962. **4a:** ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 0,09 (s, 6H); 0,88 (s, 9H); 1,10 (d, $J = 6,6$ Гц, 3H); 3,28 (s, 3H); 3,64 (dd, $J = 2,2, 4,2$ Гц, 1H, $\text{H}4'$); 3,77 (dt, $J = 4,6, 6,5$ Гц, 1H, $\text{H}5'$); 3,86 (dd, $J = 4,8, 6,8$ Гц, 1H, $\text{H}2'$); 4,40 (dd, $J = 2,2, 4,7$ Гц, 1H, $\text{H}3'$); 5,16 (d, $J = 4,9$ Гц, 1H, OH); 5,67 (dd, $J = 2,2, 8,1$ Гц, 1H); 5,86 (d, $J = 6,8$ Гц, 1H, $\text{H}1'$); 7,89 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H); 11,36 (d, $J = 1,8$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO-d_6): δ 0,60; 0,69; 23,19; 25,19; 62,84; 71,50; 74,48; 87,10; 90,47; 94,80; 107,69; 145,93; 156,11; 168,37. HRMS масса/заряд расщ. для $[\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si} + \text{H}]^+$: 387,1951; найденное значение: 387,1960.

5'-(S)-C-метил-2'-дезоксидеокси-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-фтор-уридин 3b и 5'-(R)-C-метил-2'-дезоксидеокси-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-фтор-уридин 4b получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2b**, содержащего приблизительно 55% обозначенного соединения (1,80 г, ≤ 5 ммоль) в безводном THF (10 мл), в смесь AlMe_3 (2 М в гептане, 8 мл, 16 ммоль) и безводного THF (10 мл) при 0°C в атмосфере аргона с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (1,88 г) в колонке CombiFlash с 80 г силикагеля с помощью 50% этилацетата, содержащего 1% триэтиламина в гексанах, с получением **3b** (0,88 г, 47%) и **4b** (0,17 г, 9%), а также небольшой промежуточной смешанной фракции. **3b:** ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 0,088 (s, 3H); 0,094 (s, 3H); 0,86 (s, 9H); 1,19 (d, $J = 6,5$ Гц, 3H); 3,72 (d, $J = 6,8$ Гц, 1H); 3,75-3,83 (m, 1H); 4,31 (ddd, $J = 4,4, 6,8, 18,3$ Гц, 1H, $\text{H}3'$); 5,06 (ddd, $J = 2,4, 4,4, 53,1$ Гц, 1H, $\text{H}2'$); 5,20 (d, $J =$

4,7 Гц, 1H, OH); 5,63 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 5,91 (dd, $J = 2,3, 16,9$ Гц, 1H, H1'); 7,99 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 11,4 (s, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ацетон- d_6): δ -4,84; -4,53; 18,75; 20,70; 26,14; 66,02; 71,29; 71,42; 87,98; 88,50; 88,77; 93,20; 94,71; 102,58; 141,37; 151,41; 163,74. ^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- d_6): δ -207,60 (dt, $J = 16,6, 53,1$ Гц, 1F). HRMS масса/заряд расщ. для $[\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{FN}_2\text{O}_5\text{Si} + \text{H}]^+$: 375,1752; найденное значение: 375,1744. **4b**: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 0,096 (s, 3H); 0,102 (s, 3H); 0,87 (s, 9H); 1,11 (d, $J = 6,7$ Гц, 3H); 3,74-3,78 (m, 1H); 3,84-3,94 (m, 1H); 4,43 (dt, $J = 4,8, 12,2$ Гц, 1H, H3'); 5,10 (dt, $J = 4,2, 52,8$ Гц, 1H, H2'); 5,21 (d, $J = 4,7$ Гц, 1H, OH); 5,65 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 5,94 (dd, $J = 4,0, 15,8$ Гц, 1H, H1'); 7,89 (d, $J = 8,1$ Гц, 1H); 11,4 (s, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, CD $_3$ OD): δ -4,56; -4,10; 19,11; 19,89; 26,45; 67,67; 70,62; 70,74; 88,28; 88,55; 89,99; 92,89; 94,40; 103,39; 142,71; 152,28; 165,67. ^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетон- d_6): δ -208,28 (dt, $J = 14,3, 52,8$ Гц, 1F). HRMS масса/заряд расщ. для $[\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{FN}_2\text{O}_5\text{Si} + \text{H}]^+$: 375,1752; найденное значение: 375,1760.

5'-(S)-C-метил-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-тимидин 3с и **5'-(R)-C-метил-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-тимидин 4с** получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2с**, содержащего примерно 60% обозначенного соединения (1,21 г, $\leq 3,4$ ммоль) в безводном THF (10 мл), в смесь AlMe $_3$ (2 М в гептане, 6 мл, 12 ммоль) и безводного THF (10 мл) при 0°C в атмосфере аргона с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (1,21 г) в 2-х последовательных флеш-колонках с силикагелем (CombiFlash, 80 г и 24 г) с помощью градиента (от 80 до 100%) простого этилового эфира, содержащего 1% триэтиламина в гексанах. Фракции, содержащие отделенные эпимеры, извлекали по отдельности, а промежуточные смешанные фракции объединяли и проводили хроматографию на второй колонке. Получали 0,65 г (52%) **3с** и 0,11 г (9%) **4с**, а также небольшую промежуточную смешанную фракцию. **3с**: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 0,07 (s, 6H); 0,86 (s, 9H); 1,13 (d, $J = 6,5$ Гц, 3H); 1,76 (d, $J = 1,0$ Гц, 3H); 2,01 (ddd, $J = 3,0, 6,0, 13,2$ Гц, 1H, H2'а); 2,13 (ddd, $J = 5,9, 7,7,$

13,4 Гц, 1H, H2'В); 3,58 (t, $J = 2,7$ Гц, 1H, H4'); 3,74-3,83 (m, 1H, H5'); 4,40 (квинтет, $J = 2,8$ Гц, 1H, H3'); 5,02 (d, $J = 4,6$ Гц, 1H, OH); 6,15 (dd, $J = 6,0, 7,7$ Гц, 1H, H1'); 7,84 (d, $J = 1,2$ Гц, 1H); 11,27 (s, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ACN-d₃): δ -4,58; -4,39; 12,72; 18,63; 20,65; 26,20; 41,14; 67,55; 73,94; 85,97; 97,74; 111,06; 137,89; 151,76; 165,10. HRMS масса/заряд расщ. для [C₁₇H₃₀N₂O₅Si + Na]⁺: 393,1822; найденное значение: 393,1825.

4с: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 0,081 (s, 3H); 0,084 (s, 3H); 0,87 (s, 9H); 1,10 (d, $J = 6,5$ Гц, 3H); 1,76 (d, $J = 1,1$ Гц, 3H); 1,95 (ddd, $J = 1,7, 5,5, 13,1$ Гц, 1H, H2'А); 2,14 (ddd, $J = 5,4, 9,0, 13,2$ Гц, 1H, H2'В); 3,55 (dd, $J = 1,6, 4,7$ Гц, 1H, H4'); 3,73 (dt, $J = 4,9, 6,4$ Гц, 1H, H5'); 4,49 (dt, $J = 1,4, 5,3$ Гц, 1H, H3'); 5,03 (d, $J = 5,0$ Гц, 1H, OH); 6,15 (dd, $J = 5,5, 8,9$ Гц, 1H, H1'); 7,66 (d, $J = 1,2$ Гц, 1H); 11,29 (s, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, ACN-d₃): δ -4,52; -4,25; 12,67; 18,55; 20,21; 26,19; 41,10; 68,26; 72,46; 86,07; 92,35; 111,27; 137,75; 151,83; 165,09. HRMS масса/заряд расщ. для [C₁₇H₃₀N₂O₅Si + H]⁺: 371,2002; найденное значение: 371,1992.

N-ацетил-5'-(S)-C-метил-3'-O-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-O-метил-цитидин **3d** получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2d**, содержащего приблизительно 56% обозначенного соединения (2,80 г, $\leq 6,8$ ммоль) в безводном THF (20 мл), в смесь AlMe₃ (2 М в гептане, 12 мл, 24 ммоль) и безводного THF (20 мл) при 0°C в атмосфере аргона с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (3,03 г) в 2-х последовательных флеш-колонках с силикагелем (CombiFlash, 80 г и 40 г) с помощью градиента (от 70 до 100%) этилацетата в гексанах с получением 1,09 г (37%) менее полярного (S)-эпимера **3d**, а также 0,60 г более полярной фракции, содержащей смесь **3d** и **4d**, которую дополнительно не разделяли.

3d: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 0,05 (s, 6H); 0,85 (s, 9H); 1,21 (d, $J = 6,5$ Гц, 3H); 2,09 (s, 3H); 3,43 (s, 3H); 3,70-3,76 (m, 2H); 3,77-3,85 (m, 1H); 4,21 (dd, $J = 4,8, 7,0$ Гц, 1H); 5,19 (d, $J = 4,4$ Гц, 1H); 5,83 (d, $J = 2,0$ Гц, 1H); 7,18 (d, $J = 7,5$ Гц, 1H); 8,58 (d, $J = 7,5$ Гц, 1H); 10,90 (s, 1H).

Примечание: *N*-ацетилцитидины не слишком стабильны на колонке с силикагелем в присутствии триэтиламина и склонны к диспропорционированию с образованием *N*-незащищенных и *N*-диацетилированных производных. Таким образом, триэтиламин не использовали для разделения изомеров **3d** и **4d**. Однако добавление триэтиламина полезно для лучшего разделения изомеров при TLC.

N*-бензоил-5'-(*S*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-аденозин **3e** и *N*-бензоил-5'-(*R*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-аденозин **4e* получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2e**, содержащего приблизительно 50% обозначенного соединения (16,9 г, \leq 34 ммоль) в безводном THF (100 мл), в смесь AlMe₃ (2 М в гептане, 51 мл, 102 ммоль) и безводного THF (100 мл) при 0°C в атмосфере аргона с последующим перемешиванием при комнатной температуре в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (15,9 г) в флеш-колонке с силикагелем (CombiFlash, 220 г) с помощью градиента (от 70 до 100%) этилацетата в гексанах с получением очищенной смеси эпимеров (~1:1): 8,52 г, 49%. Изомеры дополнительно разделяли посредством препаративной C18 RP-HPLC, используя систему очистки Gilson PLC 2020: 1 г смеси вводили и элюировали посредством изократического способа с помощью 25 mM бикарбоната триэтиламмония и 65% ацетонитрила. Соответствующие фракции с чистотой >95% согласно HPLC объединяли и выпаривали до сухости с получением 0,15 г **3e** (dr > 97%) и 0,25 г чистого стереоизомера **4e**. **3e**: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 0,124 (s, 3H); 0,126 (s, 3H); 0,91 (s, 9H); 1,17 (d, *J* = 6,4 Гц, 3H); 3,32 (s, 3H); 3,81-3,90 (m, 2H); 4,40 (dd, *J* = 4,9, 5,7 Гц, 1H); 4,54 (dd, *J* = 3,2, 4,5 Гц, 1H); 5,19 (d, *J* = 5,7 Гц, 1H); 6,16 (d, *J* = 5,7 Гц, 1H); 7,55 (t расщепление, *J* = 7,8 Гц, 2H); 7,64 (t расщепление, *J* = 7,4 Гц, 1H); 8,03 (d, *J* = 1,4 Гц, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,80 (s, 1H); 11,23 (s, 1H). **4e**: ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆): δ 0,146 (s, 3H); 0,147 (s, 3H); 0,93 (s, 9H); 1,10 (d, *J* = 6,4 Гц, 3H); 3,25 (s, 3H); 3,75 (dd, *J* = 1,1, 5,6 Гц, 1H); 3,89 (секстет, *J* = 5,7 Гц, 1H); 4,60 (dd, *J* = 4,5, 7,4 Гц, 1H); 4,63 (dd, *J* = 1,2, 4,6 Гц, 1H); 5,32 (d, *J* = 4,7 Гц, 1H); 6,11 (d, *J*

= 7,4 Гц, 1H); 7,55 (t, $J = 8,0$ Гц, 2H); 7,64 (t расщепление, $J = 7,5$ Гц, 1H); 8,03 (d, $J = 1,4$ Гц, 1H); 8,05 (d, $J = 0,9$ Гц, 1H); 8,76 (s, 1H); 8,77 (s, 1H); 11,23 (s, 1H).

***N*-изобутирил-5'-(*S*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-гуанозин 3f** и ***N*-изобутирил-5'-(*R*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-гуанозин 4f** получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2f**, содержащего приблизительно 53% обозначенного соединения (1,63 г, $\leq 3,4$ ммоль) в безводном DCM (10 мл), в смесь AlMe₃ (2 М в гептане, 10 мл, 20 ммоль) и безводного DCM (10 мл) при -78°C в атмосфере аргона с последующим медленным (на бане) нагреванием до комнатной температуры в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (1,59 г) в флеш-колонке с силикагелем (CombiFlash, 40 г) с помощью градиента (от 0 до 4%) метанола в хлороформе с получением 0,14 г менее полярного (*R*)-изомера **4f**, 0,36 г промежуточной смеси **3f** и **4f** и 0,25 г более полярного (*S*)-изомера **3f**. Промежуточную фракцию разделяли на второй колонке в изократическом режиме (CombiFlash, 40 г) с помощью 3% метанола в хлороформе с получением дополнительно 0,20 г **4f** и 0,16 г **3f**. Общий выход **3f**: 0,34 г (23%) и **4f**: 0,41 г (27%). **3f**: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 0,10 (s, 3H); 0,11 (s, 3H); 0,89 (s, 9H); 1,11 (d, $J = 6,8$ Гц, 6H); 1,12 (d, $J = 6,4$ Гц, 3H); 2,77 (септет, $J = 6,8$ Гц, 1H); 3,29 (s, 3H); 3,76 (t, $J = 2,6$ Гц, 1H); 3,79-3,87 (m, 1H); 4,20 (dd, $J = 4,8, 6,3$ Гц, 1H); 4,44 (dd, $J = 2,6, 4,6$ Гц, 1H); 5,12 (d, $J = 4,6$ Гц, 1H); 5,88 (d, $J = 6,3$ Гц, 1H); 8,36 (s, 1H); 11,61 (s, 1H); 12,10 (s, 1H). **4f**: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 0,12 (s, 3H); 0,13 (s, 3H); 0,90 (s, 9H); 1,08 (d, $J = 6,4$ Гц, 3H); 1,11 (d, $J = 6,8$ Гц, 6H); 2,76 (септет, $J = 6,8$ Гц, 1H); 3,25 (s, 3H); 3,66 (d, $J = 5,6$ Гц, 1H); 3,76 (секстет, $J = 6,0$ Гц, 1H); 4,36 (dd, $J = 4,6, 7,8$ Гц, 1H); 4,54 (d, $J = 4,5$ Гц, 1H); 5,16 (d, $J = 5,1$ Гц, 1H); 5,83 (d, $J = 7,8$ Гц, 1H); 8,32 (s, 1H); 11,60 (s, 1H); 12,10 (s, 1H).

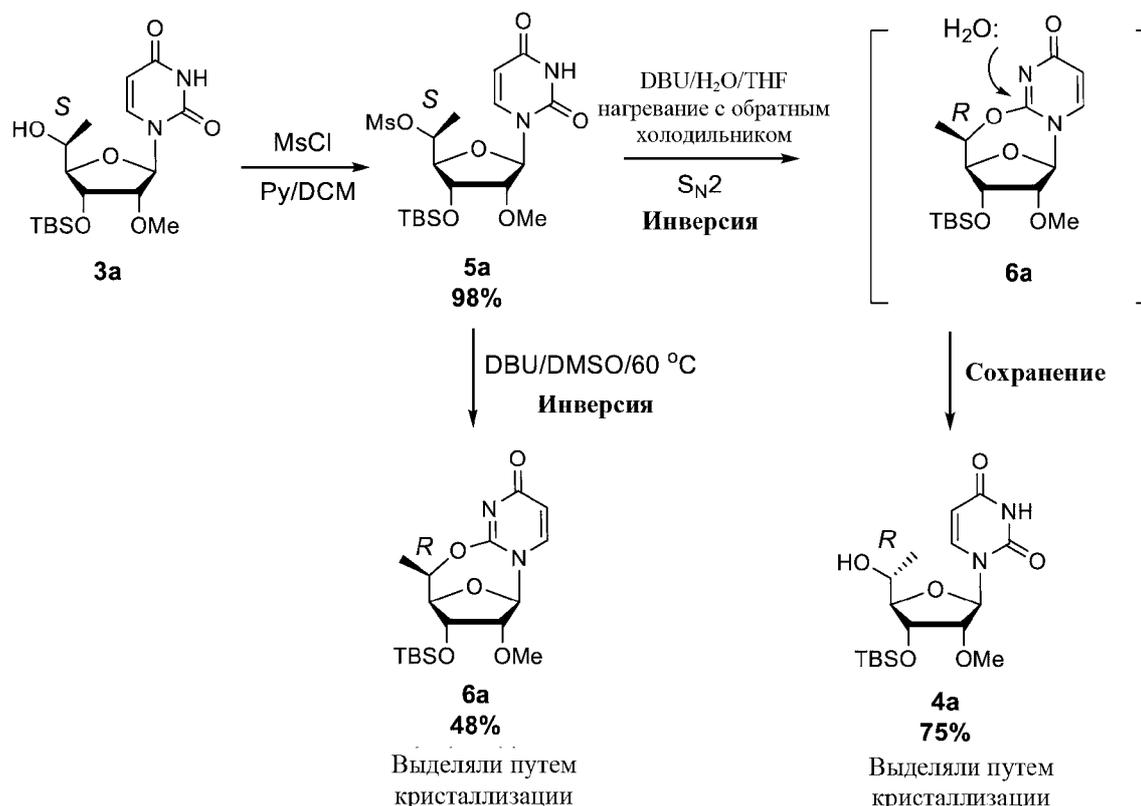
с. Порядок осуществления стереоселективной реакции пуриновых-5'-оксонуклеозидов с диметилцинком

***N*-бензоил-5'-(*S*)-*C*-метил-3'-*O*-[(1,1-**

диметилэтил) диметилсилил]-2'-O-метил-аденозин 3e. Раствор неочищенного альдегида **2e**, содержащий приблизительно 55% обозначенного соединения (1,69 г, $\leq 3,4$ ммоль) в безводном DCM (10 мл), медленно добавляли по каплям в течение примерно 20 минут в перемешиваемую и охлажденную (-78°C) смесь ZnMe_2 (2 М в толуоле, 6 мл, 12 ммоль) и безводного DCM (10 мл) в атмосфере аргона. Раствор оставляли медленно нагреваться (на бане) до комнатной температуры в течение ночи, охлаждали до 0°C и гасили путем осторожного добавления 10% фосфорной кислоты. Органическую фазу отделяли, промывали 5% соевым раствором и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли в вакууме и неочищенный остаток (1,57 г) очищали посредством флеш-хроматографии в колонке CombiFlash с 40 г силикагеля с помощью градиента (от 70 до 100%) этилацетата в гексанах с получением **3e** (0,96 г, 55%) при $\sim 90\%$ диастереоизомерной чистоте. Соединение растворяли в 5 мл диэтилового эфира, а затем медленно добавляли при перемешивании гексан (4 мл), что запускало кристаллизацию. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, фильтровали и твердое вещество дважды промывали смесью простой эфир-гексаны 1:2 с получением 0,69 г (73% по кристаллизации) **3e** при $\sim 97\%$ диастереоизомерной чистоте.

N-изобутирил-5'-(S)-C-метил-3'-O-[(1,1-диметилэтил) диметилсилил]-2'-O-метилгуанозин 3f получали аналогично путем добавления раствора неочищенного альдегида **2f**, содержащего примерно 53% обозначенного соединения (1,63 г, $\leq 3,4$ ммоль) в безводном DCM (10 мл), в смесь ZnMe_2 (2 М в толуоле, 8,5 мл, 17 ммоль) и безводного DCM (10 мл) при -78°C в атмосфере аргона с последующим медленным (на бане) нагреванием до комнатной температуры в течение ночи. Проводили хроматографию неочищенного остатка (1,56 г), содержащего **3f** и **4f** в соотношении $\sim 3:1$, в флеш-колонке с силикагелем (CombiFlash, 40 г) с помощью 2% метанола в хлороформе с получением 0,13 г смеси **4f** и **3f** с последующей очисткой **3f** 0,48 г (32%).

d. Стереоспецифическое взаимопревращение 5'-алкил-эпимеров



5'-(*S*)-*C*-метил-5'-*O*-месил-3'-*O*-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-*O*-метил-уридин **5a.** Метансульфонила хлорид (5,5 мл, 72 ммоль) добавляли по каплям за период ~5 минут к охлажденному (0°C) и перемешиваемому раствору (*S*)-эпимера (**3a**) (8,32 г, 21,6 ммоль) и безводного пиридина (5,8 мл, 72 ммоль) в безводном DCM (80 мл) в атмосфере аргона. Охлаждающую баню удаляли, смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 часов, охлаждали до 0°C и гасили путем осторожного добавления насыщенного раствора бикарбоната натрия (200 мл). Охлаждающую баню удаляли, смесь энергично перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, органическую фазу отделяли, последовательно промывали с помощью 10% фосфорной кислоты, 5% солевого раствора, дважды, и сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли в вакууме и остаток сушили с вакууме с высокой степенью разрежения с получением практически чистого **5a** (9,79 г, 98%) в виде оранжевой пены. **5a**: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 0,09 (s, 3H); 0,10 (s, 3H); 0,87 (s, 9H); 1,42 (d, $J = 6,5$ Гц, 3H); 3,20 (s, 3H); 3,33 (s, 3H); 3,86 (t, $J = 4,9$ Гц, 1H); 3,89 (t, $J = 4,9$ Гц, 1H); 4,29 (t, $J = 5,1$ Гц, 1H);

4,91 (dt, $J = 6,4, 11,3$ Гц, 1H); 5,68 (dd, $J = 2,2, 8,1$ Гц, 1H); 5,86 (d, $J = 4,7$ Гц, 1H); 7,65 (d, $J = 8,2$ Гц, 1H); 11,42 (s, 1H).

6,9-эпокси-2H,6H-пиримидо[2,1-b][1,3]оксазацин-2-он-7,8,10-тригидро-9-(R)-метил-8-О-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-7-метокси-[6R-(6 α ,7 α ,8 α ,9 α)] 6a. Раствор мезилата **5a** (2,33 г, 5 ммоль) и DBU (1,5 мл, 10 ммоль) в безводном DMSO (10 мл) перемешивали при 60°C в атмосфере аргона в течение 27 часов, охлаждали до 0°C и добавляли этилацетат (40 мл), а затем 5% водный раствор NaCl (80 мл). Органическую фазу отделяли, промывали смесью 1:1 5% раствора NaCl и 10% водного раствора фосфорной кислоты, а затем 5% раствором NaCl, насыщенным бикарбонатом натрия и насыщенным раствором NaCl. После высушивания над безводным сульфатом натрия растворитель удаляли в вакууме с получением неочищенного безводного продукта **6a** (1,57 г), который нагревали с обратным холодильником с 30 мл диэтилового эфира в течение 45 минут, охлаждали до комнатной температуры, перемешивали в течение 2 часов, белый осадок фильтровали, промывали дважды диэтиловым эфиром и сушили с получением 0,88 г (48%) чистого соединения **6a**. **6a**: ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6): δ 0,06 (s, 3H); 0,7 (s, 3H); 0,84 (s, 9H); 1,36 (d, $J = 6,7$ Гц, 3H); 3,29 (s, 3H); 4,13 (dd, $J = 0,8, 6,0$ Гц, 1H); 4,27 (s, 1H); 4,32 (q, $J = 6,8$ Гц, 1H); 4,62 (d, $J = 5,9$ Гц, 1H); 5,78 (s, 1H); 5,89 (d, $J = 7,4$ Гц, 1H); 7,95 (d, $J = 7,4$ Гц, 1H). ^{13}C ЯМР (126 МГц, DMSO- d_6): δ -5,22; -4,81; 16,79; 17,91; 25,59; 57,93; 71,42; 81,77; 86,33; 91,16; 96,24; 109,09; 142,58; 156,29; 170,67.

5'-(R)-С-метил-3'-О-[(1,1-диметилэтил)диметилсилил]-2'-О-метил-уридин 4a (из 5a). Раствор мезилата **5a** (3,72 г, 8 ммоль), DBU (2,4 мл, 16 ммоль) и воды (10 мл) в THF (50 мл) нагревали с обратным холодильником в атмосфере аргона в течение 67 часов. Растворитель удаляли в вакууме, остаток разделяли между этилацетатом (120 мл) и смесью из 80 мл 5% NaCl и 30 мл 10% фосфорной кислоты, органическую фазу отделяли, дважды промывали 5% NaCl, а затем насыщенным NaCl. После высушивания над безводным сульфатом натрия неочищенный остаток (3,04 г)

нагревали с обратным холодильником со смесью из 30 мл диэтилового эфира и 15 мл гексанов в течение 1 часа, охлаждали до комнатной температуры, перемешивали в течение ночи, белый осадок фильтровали и дважды промывали смесью простой эфир-гексаны 1:1 с получением 2,32 г (75%) **4a**.

Описанный в данном примере способ можно использовать для синтеза разных 5'-алкил-нуклеозидов для любых применений с целью терапии (например, применения в качестве противовирусного и противоопухолевого средства), в том числе олигонуклеотидов и малых молекул.

Пример 9. Стерическое блокирование фосфодиэфирной (PO), фосфотриоатной (PS) и фосфодитриоатной (PS2) связей путем введения нуклеотида с 4'- и 5'-модификацией в 3'-конец PO-, PS- или PS2-связи

Авторы настоящего изобретения установили, что введение нуклеотида с 4'-модификацией и/или 5'-модификацией в 3'-конец фосфодиэфирной (PO), фосфотриоатной (PS) и/или фосфодитриоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении однонитевого или двухнитевого олигонуклеотида может оказывать стерический эффект на межнуклеотидную связь и, следовательно, защитить ее от действия нуклеаз или сделать устойчивой к ним.

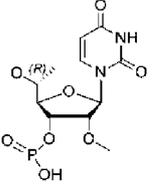
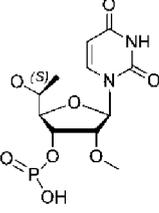
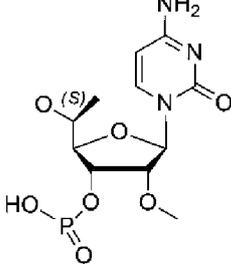
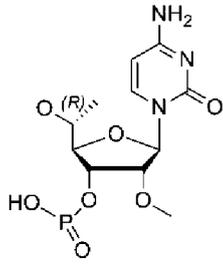
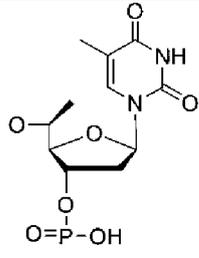
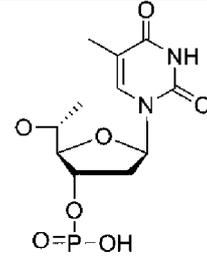
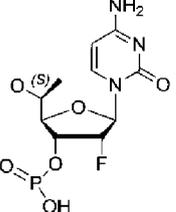
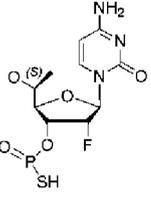
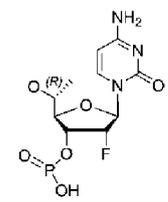
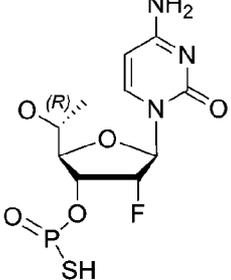
В данном примере оценивали активность *in vitro* сайленсинга генов у siRNA, нацеленной на F7, которая содержит 4'-O-метилированные или 5'-метилированные нуклеотиды в выбранном положении, при этом результаты показаны в таблице 11.

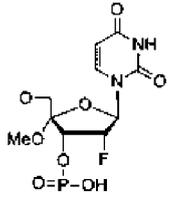
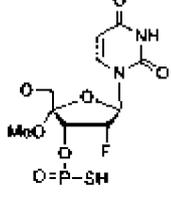
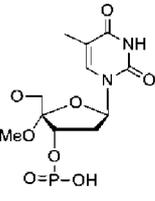
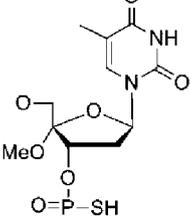
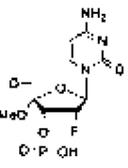
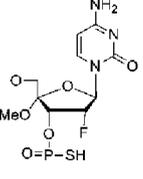
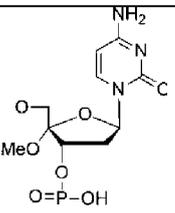
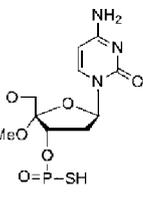
Таблица 11. Активность *in vitro* сайленсинга генов у siRNA, нацеленной на F7, которая содержит 4'-O-метилированные или 5'-метилированные нуклеотиды в выбранном положении

ID дуплекса	Смысловая нить	Антисмысловая нить	10 нМ		0,1 нМ	
			Средн. знач.	SD	Средн. знач.	SD
AD-60347	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfuUfaCfL96	gsUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgsgsc	13,2	1,9	81,4	7,2
AD-63931	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfUufaAfL96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgsgsc	5,7	0,7	41,2	3,7
AD-69122	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfU(Ufm)aAfL96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgsgsc	4,9	0,7	51,7	7,7
AD-69123	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAfaGfuCfU(UfmR)aAfL96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgAfuCfcUfgsgsc	5,4	0,9	60,6	9,5

AD-69124	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(u5m)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	5,4	1,1	53,9	6,0
AD-69125	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(u5mR)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	5,5	0,6	55,1	6,0
AD-69126	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(T5m)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	4,9	0,4	50,7	6,9
AD-69127	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(T5mR)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	3,5	0,5	34,0	5,5
AD-69128	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(Ufo)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	4,6	0,3	30,4	4,1
AD-69129	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfU(dTo)aAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	5,3	0,2	40,9	4,3
AD-69130	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	6,6	0,7	51,6	5,5
AD-69131	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUdTaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fuCfcUfgsgsc	4,7	0,3	44,8	7,1
AD-63934	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fUcfcUfgsgsc	5,2	0,7	49,2	8,4
AD-69132	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(Cfm)cUfgsgsc	6,9	1,2	57,7	7,1
AD-69133	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(CfmR)cUfgsgsc	6,5	0,9	58,2	6,1
AD-69134	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(c5m)cUfgsgsc	5,4	0,7	53,1	5,7
AD-69135	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(c5mR)cUfgsgsc	5,5	0,8	47,8	5,2
AD-69136	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(Cfo)cUfgsgsc	5,5	0,8	45,3	4,1
AD-69137	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fU(dCo)cUfgsgsc	5,1	0,4	48,6	5,9
AD-69138	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fUccUfgsgsc	5,1	0,8	48,9	4,9
AD-69139	CfsasGfgAfuCfaUfCfUfcAf aGfuCfuUfaAfl96	usUfsaAfgAfcUfuGfagaUfgA fUdTcUfgsgsc	5,1	0,6	49,6	7,1

<p>2'-фтор-5'-(S)-метил-уридин-3'- фосфат (Ufm)</p>	<p>2'-фтор-5'-(S)-метил-уридин-3'- фосфоротиоат (Ufms)</p>
<p>2'-фтор-5'-(R)-метил-уридин-3'- фосфоротиоат (UfmRs)</p>	<p>2'-фтор-5'-(R)-метил-уридин-3'- фосфат (UfmR)</p>

 <p>2'-О-метил-5'-(R)-метил-уридин-3'-фосфат (u5mR)</p>	 <p>2'-О-метил-5'-(S)-метил-уридин-3'-фосфат (u5m)</p>
 <p>2'-О-метил-5'-(S)-метил-цитидин-3'-фосфат (c5m)</p>	 <p>2'-О-метил-5'-(R)-метил-цитидин-3'-фосфат (c5mR)</p>
 <p>5'-(S)-метил-дезокситимидин-3'-фосфат (T5m)</p>	 <p>5'-(R)-метил-дезокситимидин-3'-фосфат (T5mR)</p>
 <p>2'-фтор-5'-(S)-метил-цитозин-3'-фосфат (Cfm)</p>	 <p>2'-фтор-5'-(S)-метил-цитозин-3'-фосфоротиоат (Cfms)</p>
 <p>2'-фтор-5'-(R)-метил-цитозин-3'-фосфат (CfmR)</p>	 <p>2'-фтор-5'-(R)-метил-цитозин-3'-фосфоротиоат (CfmRs)</p>

 <p>2'-фтор-4'-метоксиуридин-3'- фосфат ((Ufo)</p>	 <p>2'-фтор-4'-метоксиуридин-3'-фосфоротиоат (Ufos)</p>
 <p>4'-метокси-2'-дезокситимидин-3'- фосфат (dTp)</p>	 <p>4'-метокси-2'-дезокситимидин-3'- фосфоротиоат (dTps)</p>
 <p>2'-фтор-4'-метоксицитидин-3'- фосфат (Cfp)</p>	 <p>2'-фтор-4'-метоксицитидин-3'- фосфоротиоат (Cfps)</p>
 <p>4'-метокси-2'-деоксицитидин-3'- фосфат (dCp)</p>	 <p>4'-метокси-2'-деоксицитидин-3'- фосфоротиоат (dCps)</p>

Пример 10. Зависимая от хиральности активность гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) в siRNA-дуплексах

Химические модификации в siRNA-дуплексах необходимы для стабилизации этих молекул против разрушения нуклеазами, для облегчения их поступления в клетки и для воздействия на образование активного RISC, а также для сайленсинга мишени, опосредованного RNAi. Нарушающие термостабильность модификации, введенные в определенные положения siRNA-дуплекса, могут приводить к увеличению эффективности путем усиления сдвига нити и/или диссоциации смысловой нити при включении в комплекс RISC.

В данном примере ациклический аналог нуклеиновой кислоты,

состоящий из трех атомов углерода, гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), оценивали в контексте siRNA-дуплексов. Синтезировали GNA-содержащие siRNA-дуплексы. (S)-GNA олигомеры формировали гомодуплексы, структура которых была подобна типичному дуплексу А-формы РНК, и образуют пару с РНК, но не ДНК, в пределах последовательностей с высоким содержанием А/Т. Исследовали показатели термостабильности и устойчивости в отношении нуклеазы у siRNA-дуплексов, содержащих (S)- или (R)-GNA. Структурные исследования с использованием рентгеновской кристаллографии обеспечили дополнительную информацию об эффекте таких GNA-заместителей в дуплексах РНК. В биологических исследованиях оценивали зависимость от хиральности активность сайленсинга генов у siRNA-дуплексов, содержащих GNA.

ID дуплекса	Смысловая нить (от 5' к 3')	Антисмысловая нить (от 5' к 3')	Конструкция
AD-57727.66	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	исходное
AD-68368.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	(Tgns)UfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N1
AD-68369.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	P(Tgns)UfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: 5'-p, gN @ N2
AD-62896.4	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	us(Tgns)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N2
AD-68370.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfs(Agn)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N3
AD-68371.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsa(Tgn)aGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N4
AD-68372.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUf(Agn)GfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N5
AD-68373.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6
AD-68374.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7
AD-68375.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfa(Ggn)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N8
AD-68376.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGf(Cgn)AfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N9
AD-68377.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfc(Agn)agaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N10
AD-68378.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAf(Agn)gaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N11

AD-68379.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfa(Ggn)aAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N12
AD-68380.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfag(Agn)AfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N13
AD-68381.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfaga(Agn)cAfcUfgUfususu	AS: gN @ N14
AD-68382.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAf(Cgn)AfcUfgUfususu	AS: gN @ N15
AD-68383.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfc(Agn)cUfgUfususu	AS: gN @ N16
AD-68384.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAf(Cgn)UfgUfususu	AS: gN @ N17
AD-68385.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfc(Tgn)gUfususu	AS: gN @ N18
AD-68386.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUf(Ggn)Ufususu	AS: gN @ N19
AD-68387.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfg(Tgn)ususu	AS: gN @ N20
AD-68388.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUf(Tgns)usu	AS: gN @ N21
AD-68389.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfus(Tgns)u	AS: gN @ N22
AD-68390.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfus(Tgn)	AS: gN @ N23
AD-68391.2	(Agn)asCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N1
AD-68392.2	Afs(Agn)CfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N2
AD-68393.2	Afsas(Cgn)aGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N3
AD-68394.2	AfsasCf(Agn)GfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N4
AD-68395.2	AfsasCfa(Ggn)uGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N5
AD-68396.2	AfsasCfaGf(Tgn)GfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N6
AD-68397.2	AfsasCfaGfu(Ggn)uUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N7
AD-68398.2	AfsasCfaGfuGf(Tgn)UfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N8
AD-68399.2	AfsasCfaGfuGfu(Tgn)CfuFuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N9
AD-68400.2	AfsasCfaGfuGfuUf(Cgn)UfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N10
AD-	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tgn)uGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N11

62900.1			
AD-68401.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuF(Tgn)GfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N12
AD-68402.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFu(Ggn)cUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N13
AD-68403.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGf(Cgn)UfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N14
AD-68404.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfc(Tgn)cUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N15
AD-68405.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N16
AD-68406.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfc(Tgn)aUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N17
AD-68407.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUf(Agn)UfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N18
AD-68408.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfa(Tgn)aAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N19
AD-68409.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUf(Agn)Afl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N20
AD-68410.2	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfa(Agn)L96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	S: gN @ N21

ID дуплекса	Смысловая нить (от 5' к 3')	Антисмысловая нить (от 5' к 3')	Конструкция
AD-57727.66	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	Parent
AD-69078.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUfa(Agn)L96	(Tgns)UfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N1; S: gN @ N21
AD-69079.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfaUf(Agn)Afl96	us(Tgns)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N2; S: gN @ N20
AD-69080.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUfa(Tgn)aAfl96	usUfs(Agn)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N3; S: gN @ N19
AD-69081.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfcUf(Agn)UfaAfl96	usUfsa(Tgn)aGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N4; S: gN @ N18
AD-69082.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUfc(Tgn)aUfaAfl96	usUfsaUf(Agn)GfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N5; S: gN @ N17
AD-69083.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfl96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N16
AD-69084.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGfc(Tgn)cUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N15
AD-69085.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFuGf(Cgn)UfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfa(Ggn)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N8; S: gN @ N14
AD-69086.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfuFu(Ggn)cUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGf(Cgn)AfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N9; S: gN @ N13
AD-	AfsasCfaGfuGfuUfCfuF(Tgn)GfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGfaGfc(Agn)agaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N10;

69087.1			S: gN @ N12
AD-69088.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tgn)uGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAf(Agn)gaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N11; S: gN @ N11
AD-69089.1	AfsasCfaGfuGfuUf(Cgn)UfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfa(Ggn)aAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N12; S: gN @ N10
AD-69090.1	AfsasCfaGfuGfu(Tgn)CfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfag(Agn)AfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N13; S: gN @ N9
AD-69091.1	AfsasCfaGfuGf(Tgn)UfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfaga(Agn)cAfcUfgUfususu	AS: gN @ N14; S: gN @ N8
AD-69092.1	AfsasCfaGfu(Ggn)uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAf(Cgn)AfcUfgUfususu	AS: gN @ N15; S: gN @ N7
AD-69093.1	AfsasCfaGf(Tgn)GfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfc(Agn)cUfgUfususu	AS: gN @ N16; S: gN @ N6
AD-69094.1	AfsasCfa(Ggn)uGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAf(Cgn)UfgUfususu	AS: gN @ N17; S: gN @ N5
AD-69095.1	AfsasCf(Agn)GfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfc(Tgn)gUfususu	AS: gN @ N18; S: gN @ N4
AD-69096.1	Afsas(Cgn)aGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUf(Ggn)Ufususu	AS: gN @ N19; S: gN @ N3
AD-69097.1	Afs(Agns)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfg(Tgn)ususu	AS: gN @ N20; S: gN @ N2
AD-69098.1	(Agns)asCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUf(Tgns)usu	AS: gN @ N21; S: gN @ N1
AD-69099.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfc(Tgn)cUfaUfaAfL96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N15
AD-69100.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfc(Tgn)aUfaAfL96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N17
AD-69101.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfL96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N16
AD-69102.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfc(Tgn)aUfaAfL96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N17
AD-69103.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfc(Tgn)cUfaUfaAfL96	usUfs(Agn)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N3; S: gN @ N15
AD-69104.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfL96	usUfs(Agn)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N3; S: gN @ N16
AD-69105.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfc(Tgn)aUfaAfL96	usUfs(Agn)UfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N3; S: gN @ N17
AD-69106.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfc(Tgn)cUfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfa(Ggn)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N8; S: gN @ N15
AD-69107.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfL96	usUfsaUfaGfa(Ggn)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N8; S: gN @ N16
AD-69108.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfc(Tgn)aUfaAfL96	usUfsaUfaGfa(Ggn)cAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N8; S: gN @ N17
AD-69109.1	Afs(Agns)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfL96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N2

AD-69110.1	Afs(Agns)CfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N2
AD-69111.1	AfsasCfaGf(Tgn)GfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N6
AD-69112.1	AfsasCfaGf(Tgn)GfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N6
AD-69113.1	AfsasCfaGfu(Ggn)uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N7
AD-69114.1	AfsasCfaGfu(Ggn)uUfCfUfuGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N7
AD-69115.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa(Agn)L96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N21
AD-69116.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUfcUfaUfa(Agn)L96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N21
AD-69117.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tgn)uGfcUfcUfaUfaAfl96	us(Tgns)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N2; S: gN @ N11
AD-69118.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUf(Tgn)GfcUfcUfaUfaAfl96	us(Tgns)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N2; S: gN @ N12
AD-69119.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tgn)uGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfa(Ggn)aGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N6; S: gN @ N11
AD-69120.1	AfsasCfaGfuGfuUfCf(Tgn)uGfcUfcUfaUfaAfl96	usUfsaUfaGf(Agn)GfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N7; S: gN @ N11
AD-69121.1	AfsasCfaGfuGfuUfCfUfuGfcUf(Cgn)UfaUfaAfl96	us(Tgns)aUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfususu	AS: gN @ N2; S: gN @ N16

Результаты показаны на фигурах 27–30.

На фигуре 27 представлен график, показывающий *in vitro* нокдаун TTR при использовании siRNA, модифицированной одним **нуклеотидом** (S)-GNA. Уровни мРНК TTR измеряли в первичных мышечных гепатоцитах после инкубации с 10 нМ siRNA в течение 24 часов. Уровни мРНК TTR оценивали с использованием RT-qPCR и нормализовали относительно клеток, обработанных PBS. Все результаты представляли собой среднее значение четырех измерений. На фигуре 27 показано влияние введения одного **нуклеотида** (S)-GNA на *in vitro* активность siRNA.

На фигуре 28А представлен график, показывающий *in vitro* нокдаун TTR при использовании siRNA, модифицированной одной **парой оснований** (S)-GNA. Уровни мРНК TTR измеряли в первичных мышечных гепатоцитах после инкубации с 10 нМ siRNA в течение 24 часов. Уровни мРНК TTR оценивали с использованием RT-qPCR и нормализовали относительно клеток, обработанных PBS. Все

результаты представляли собой среднее значение четырех измерений. На фигуре 28В показаны дуплексы, полученные посредством комбинирования, в которых смысловая и антисмысловая нити, содержащие одиночные нуклеотиды (S)-GNA, были спарены в виде гетерологичных пар оснований GNA:RNA. На фигуре 28 показано влияние введения одной **пары оснований** (S)-GNA на *in vitro* активность siRNA.

На фигуре 29 представлен график, показывающий *in vivo* уровни TTR в сыворотке мышей. Животные получали однократную дозу siRNA, составляющую 2,5 мг/кг. В указанные моменты времени до и после введения дозы у животных проводили отбор крови и образцы сыворотки анализировали с использованием анализа сэндвич-ELISA, в котором использовали антитело, конъюгированное с HRP, и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для считывания показаний при 450 нм. Все образцы анализировали в двух повторностях и каждый результат представлял собой среднее значение для мышей в каждой когорте (n=3). На фигуре 29 изображен эффект *in vivo* сайленсинга генов с использованием siRNA-дуплексов, модифицированных GNA, на уровни TTR в сыворотке мышей.

На фигуре 30 представлен график, показывающий *in vivo* количественное определение уровней мРНК TTR. Животные получали однократную дозу siRNA, составляющую 2,5 мг/кг. В указанные моменты времени после введения доз осуществляли экстрагирование РНК из гомогената печени. мРНК TTR оценивали как описано выше с помощью RT-qPCR, используя способ $\Delta\Delta C_t$ с GAPDH в качестве контрольного транскрипта, и нормализовали относительно животных, обработанных PBS. На фигуре 30 изображен эффект *in vivo* сайленсинга генов с использованием siRNA-дуплексов, модифицированных GNA, на уровни мРНК в печени мышей.

Результаты, показанные в описанных выше фигурах, демонстрируют, что введение GNA приводило к зависимому от положения нарушению термостабильности полученного дуплекса. Степень нарушения зависела от нуклеотида; при этом замена нуклеотида А или U приводила к значительно меньшему ΔT_m по сравнению с заменой на GNA нуклеотидов G или C. Введение отдельных GNA-нуклеотидов в затравочный участок siRNA-дуплексов

приводило к аналогичным уровням нокдауна мРНК TTR *in vitro*. Кроме того, для siRNA, содержащей пары оснований GNA в пределах затравочного участка, а также дуплексов, полученных посредством комбинирования, показаны более высокие уровни нокдауна *in vitro*, чем для соответствующей исходной siRNA.

In vivo сайленсинг генов хорошо коррелировал с *in vitro* результатами для дуплексов, содержащих одну замену на GNA. Двойная замена на GNA приводила к потере активности сайленсинга *in vivo* при сравнении с siRNA, имеющими одну замену.

Все патенты США, публикации заявок на патент США, иностранные патенты, иностранные заявки на патенты и не относящиеся к патентам публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Аспекты вариантов осуществления можно модифицировать, если необходимо использовать идеи различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

Эти и другие изменения можно осуществлять в вариантах осуществления в свете подробного описания выше. В целом, в нижеследующей формуле изобретения, используемые термины не должны истолковываться как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в данном описании и формуле изобретения, но должны истолковываться так, чтобы включать все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, применимых в отношении таких пунктов формулы. Соответственно, формула изобретения не ограничивается данным раскрытием.

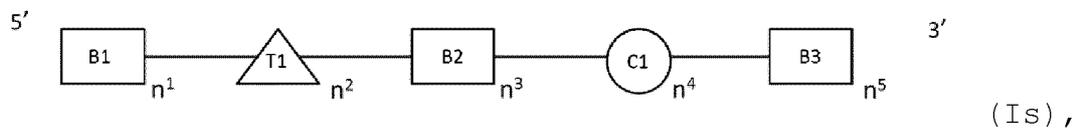
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство, представляющее собой двухнитевую РНК (dsRNA), которое способно подавлять экспрессию целевого гена, содержащее последовательность смысловой нити и последовательность антисмысловой нити, комплементарную по меньшей мере части мРНК целевого гена,

при этом каждая из смысловой и антисмысловой нитей имеет независимо от 19 до 25 нуклеотидов в длину,

смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплексный участок длиной от 17 до 23 нуклеотидных пар, и

смысловая нить представлена формулой (Is):



где:

каждый B1 независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метила и 2'-фтора;

B2 и B3 каждый представляет собой нуклеотид, содержащий 2'-O-метил-модификацию;

C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из i) нуклеотида, который образует ошибочно спаренную пару с противоположным нуклеотидом в антисмысловой нити, ii) нуклеотида, имеющего модификацию с удалением азотистого основания, и iii) нуклеотида, имеющего модификацию сахара, и расположенный напротив затравочного участка антисмысловой нити (положения 2-8);

каждый T1 представляет собой 2'-F модифицированный нуклеотид;

длина n^1 или n^3 независимо составляет от 4 до 15 нуклеотидов;

длина n^2 составляет 3 нуклеотида;

длина n^4 составляет 0-3 нуклеотида;

длина n^5 составляет 1-6 нуклеотидов; где

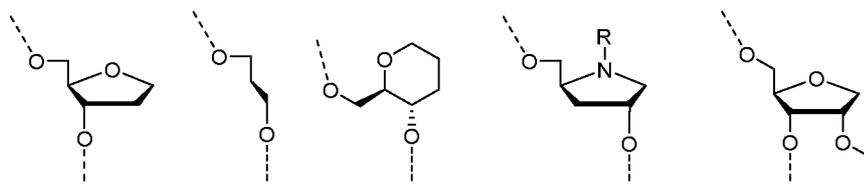
(a) смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь;

(b) смысловая цепь конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом; и

(с) один из нуклеотидов T1' находится или в (i) положении смысловой нити, которое противоположно положению 11 от 5'-конца антисмысловой нити; или (ii) положении 11 смысловой нити, считая от 5'-конца смысловой нити.

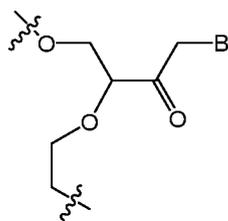
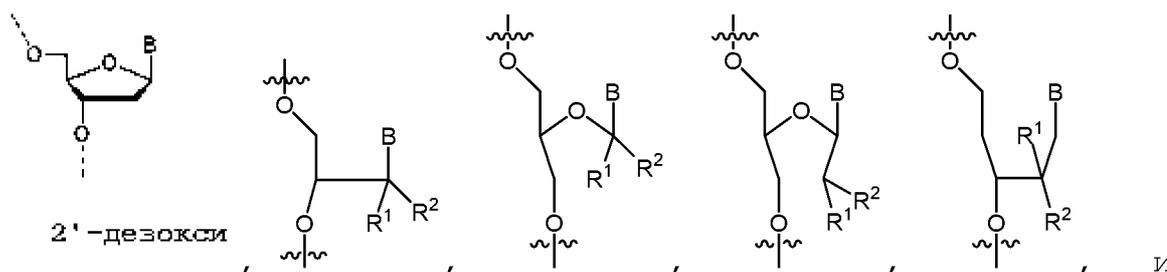
2. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1, где n^4 равняется 1.

3. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 2, где C1 выбран из группы, состоящей из модификации с удалением азотистого основания, выбранной из группы, состоящей из:



; и модификации

сахара, выбранной из группы, состоящей из:



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар.

4. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 2, где C1 представляет собой глицериновую нуклеиновую кислоту (GNA) или незапертую нуклеиновую кислоту (UNA).

5. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 2, где C1 представляет собой глицериновую нуклеиновую кислоту (GNA) и находится в сайте, противоположном положениям 5-8 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой нити.

6. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1, где каждый В1 содержит 2'-ОМе-модификацию.

7. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1, где смысловая нить имеет четыре и только четыре 2'-F-модификации, где четыре 2'-F модификации находятся в положениях 7 и 9-11 от 5'-конца смысловой нити.

8. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 1, где n^4 равняется 0.

9. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где смысловая нить содержит один или несколько блоков из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей.

10. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 9, где смысловая нить содержит один блок из двух фосфоротиоатных межнуклеотидных связей.

11. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где смысловая цепь имеет 19-22 нуклеотида.

12. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где смысловая цепь имеет 21 нуклеотид.

13. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где смысловая или антисмысловая цепи имеют 3'- и/или 5'-выступающий конец(концы), длина которого составляет 1-4 нуклеотидов.

14. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где средство, представляющее собой dsRNA, имеет выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

15. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где по меньшей мере один лиганд улучшает устойчивость к нуклеазам средства, представляющего собой dsRNA.

16. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, содержащее по меньшей мере один лиганд ASGPR.

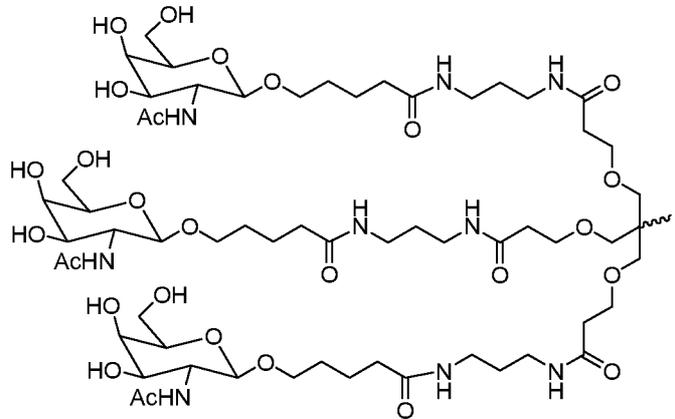
17. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 16, где лиганд ASGPR присоединен к 5'-концу смысловой нити.

18. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 16, где лиганд ASGPR присоединен к 3'-концу смысловой нити.

19. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 16, где лиганд

ASGPR представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством бивалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

20. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 19, где лиганд



ASGPR представляет собой:

21. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где dsRNA имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

22. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, имеющее дуплексный участок длиной от 19 до 21 нуклеотидных пар.

23. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, имеющее два тупых конца на обоих концах средства, представляющего собой dsRNA.

24. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где каждый B1 содержит 2'-ОМе-модификацию.

25. Средство, представляющее собой dsRNA, по п. 8, где смысловая нить имеет четыре и только четыре 2'-F-модификации, где четыре 2'-F модификации находятся в положениях 7 и 9-11 от 5'-конца смысловой нити.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая средство, представляющее собой dsRNA, по любому из пп. 1-25 отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем.

27. Способ подавления экспрессии целевого гена, предусматривающий стадию введения средства, представляющего собой dsRNA, по любому из пп. 1-25 в количестве, достаточном для подавления экспрессии целевого гена.

28. Способ по п. 27, где средство, представляющее собой dsRNA, вводят посредством подкожного или внутривенного введения.

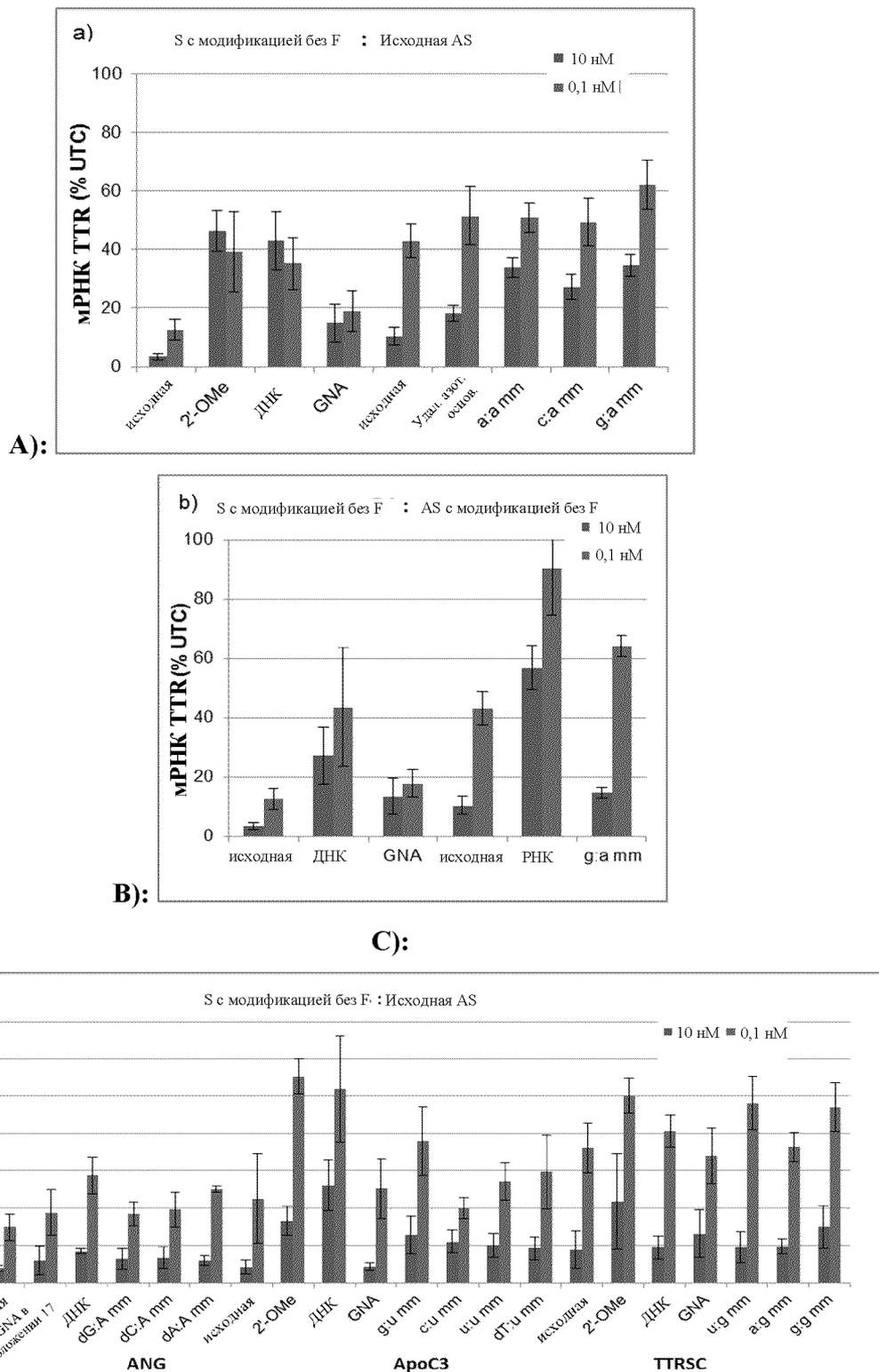
29. Способ доставки полинуклеотида к определенной мишени в субъекте путем введения средства, представляющего собой dsRNA, по любому из. 1-25.

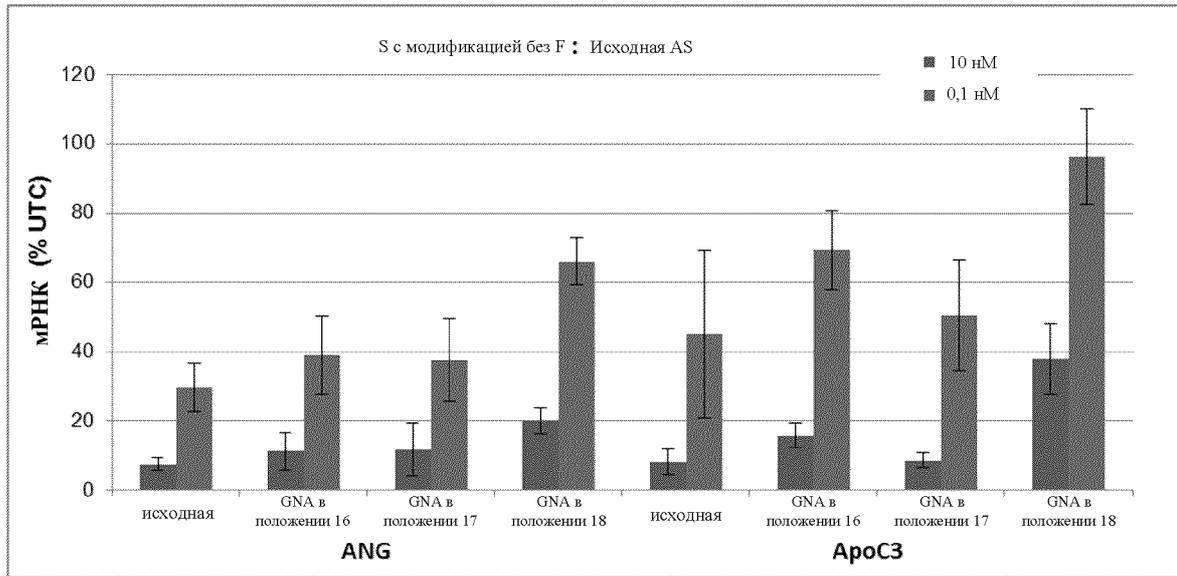
30. Способ по п. 29, где указанную стадию введения осуществляют посредством путей введения, предусматривающих внутримышечное, внутрибронхиальное, внутриплевральное, внутрибрюшинное, внутриартериальное, внутрилимфатическое, внутривенное, подкожное, цереброспинальное введение или их комбинации.

31. Способ доставки полинуклеотида к определенной мишени в субъекте, при этом способ предусматривает доставку средства, представляющего собой dsRNA, по любому из пп. 1-25 путем подкожного введения субъекту, благодаря чему полинуклеотид доставляется в определенную мишень в субъекте.

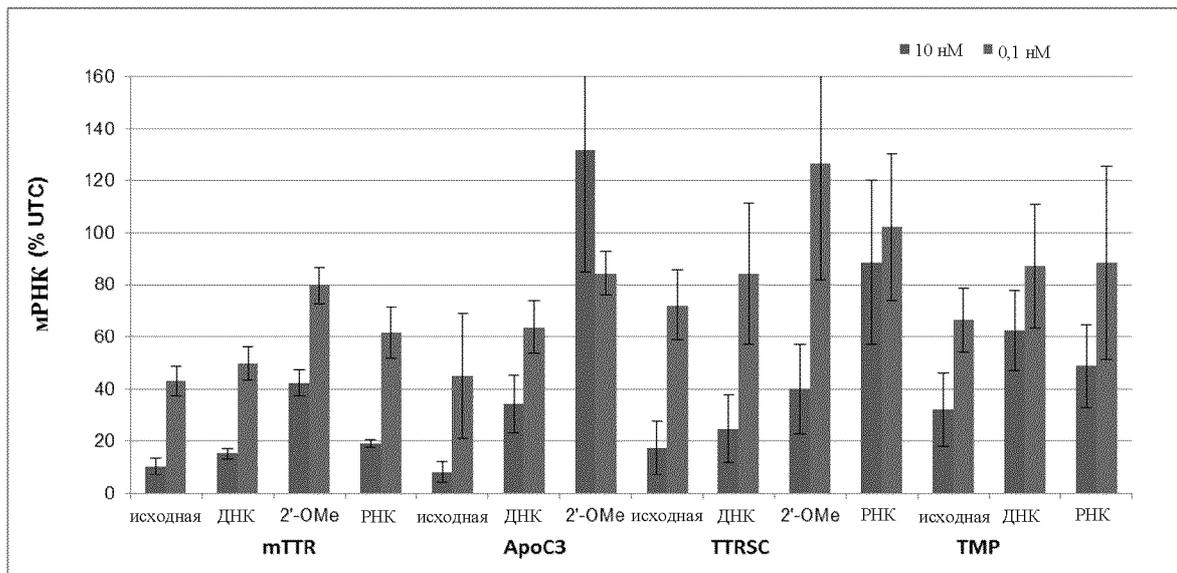
По доверенности

1/18

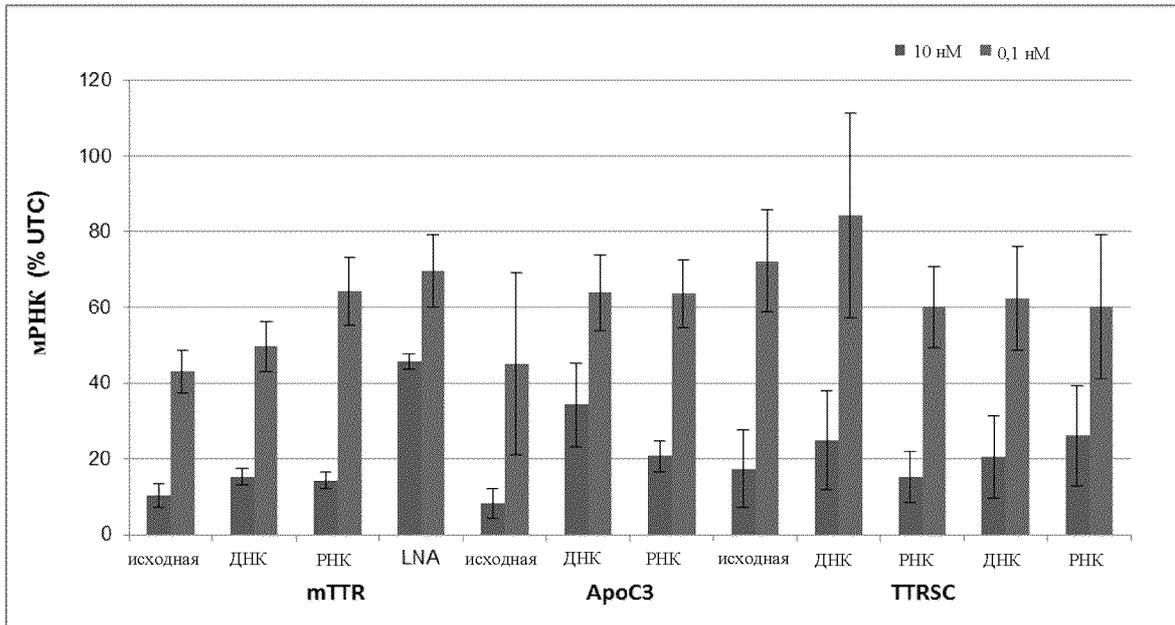




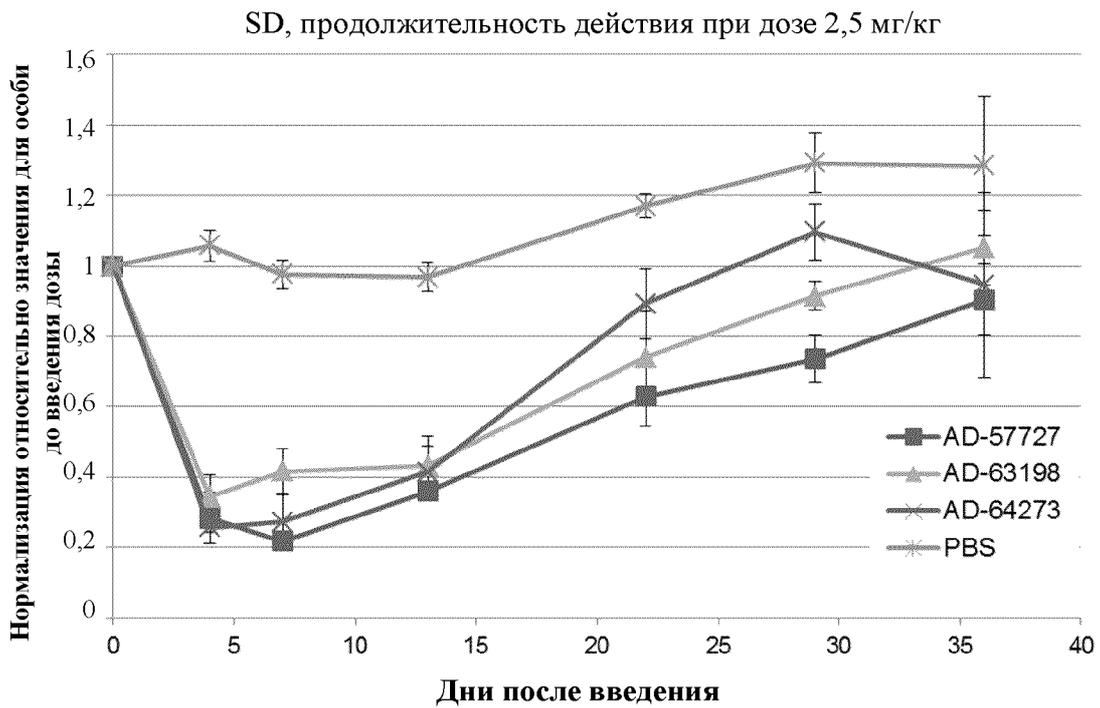
Фигура 2



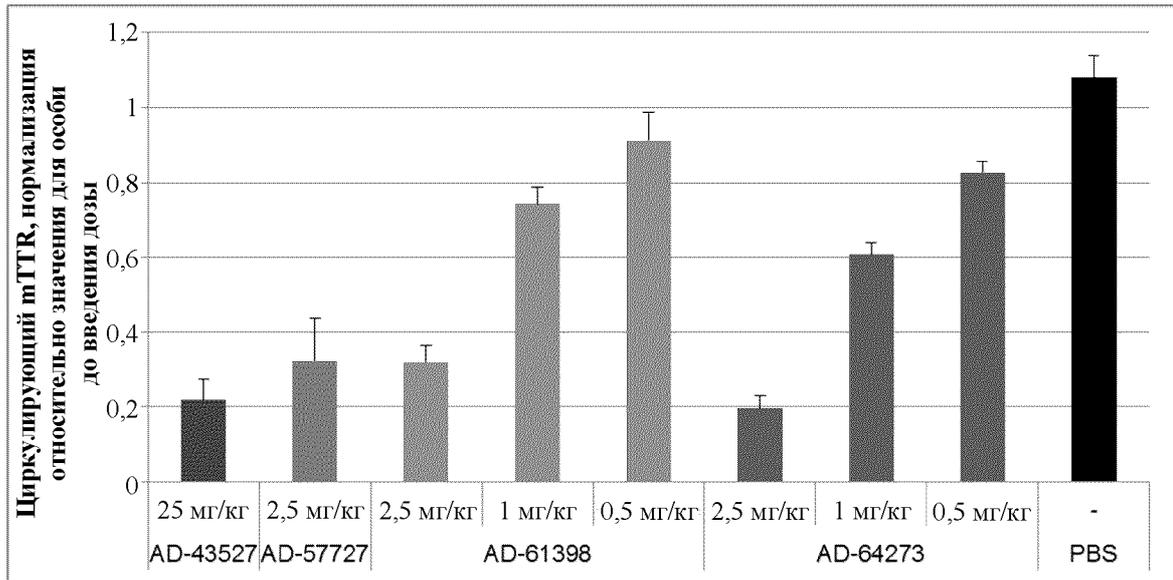
Фигура 3



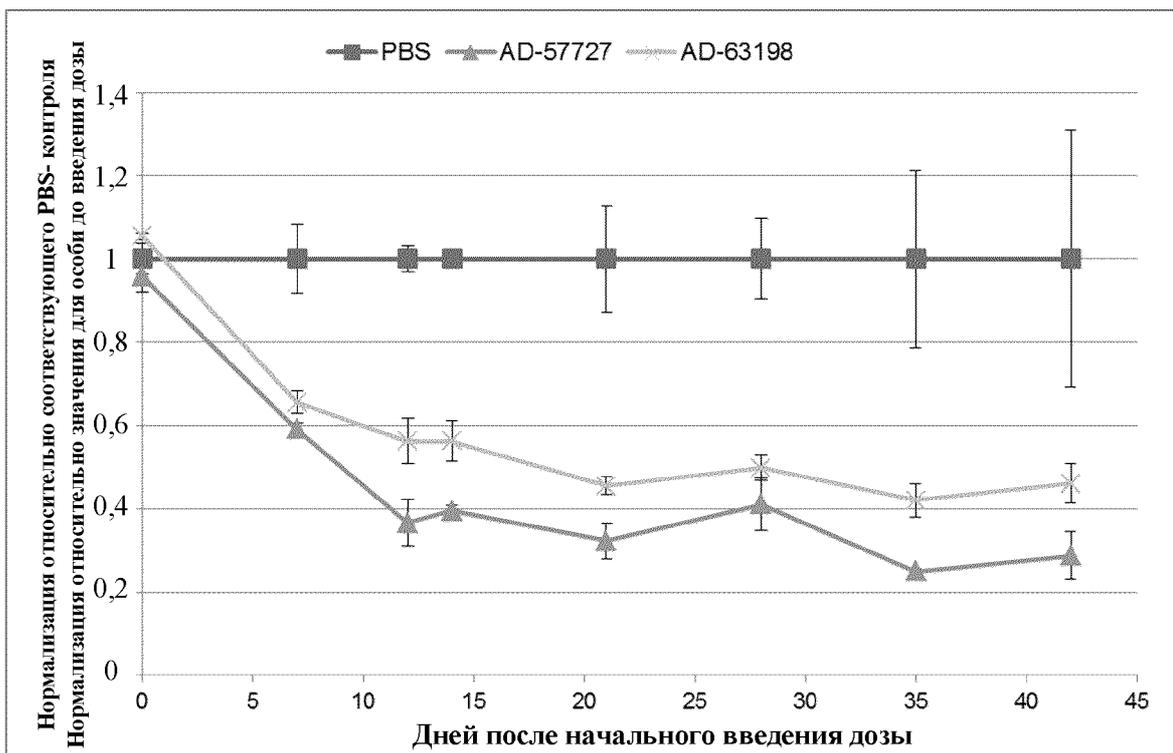
Фигура 4



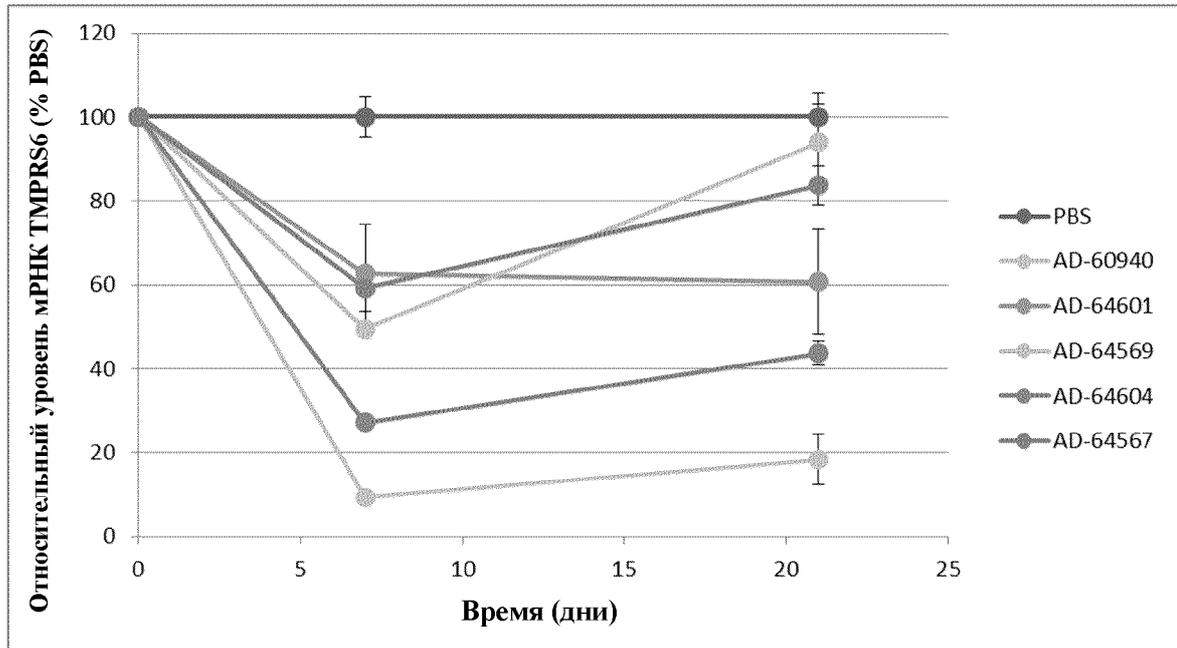
Фигура 5



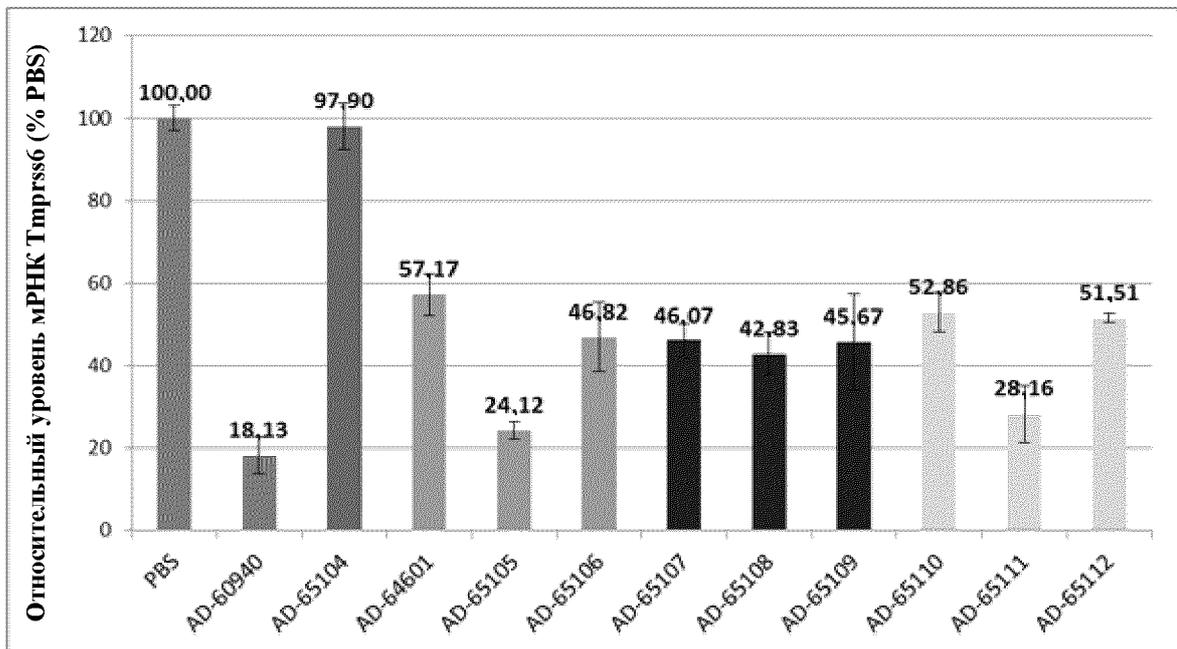
Фигура 6



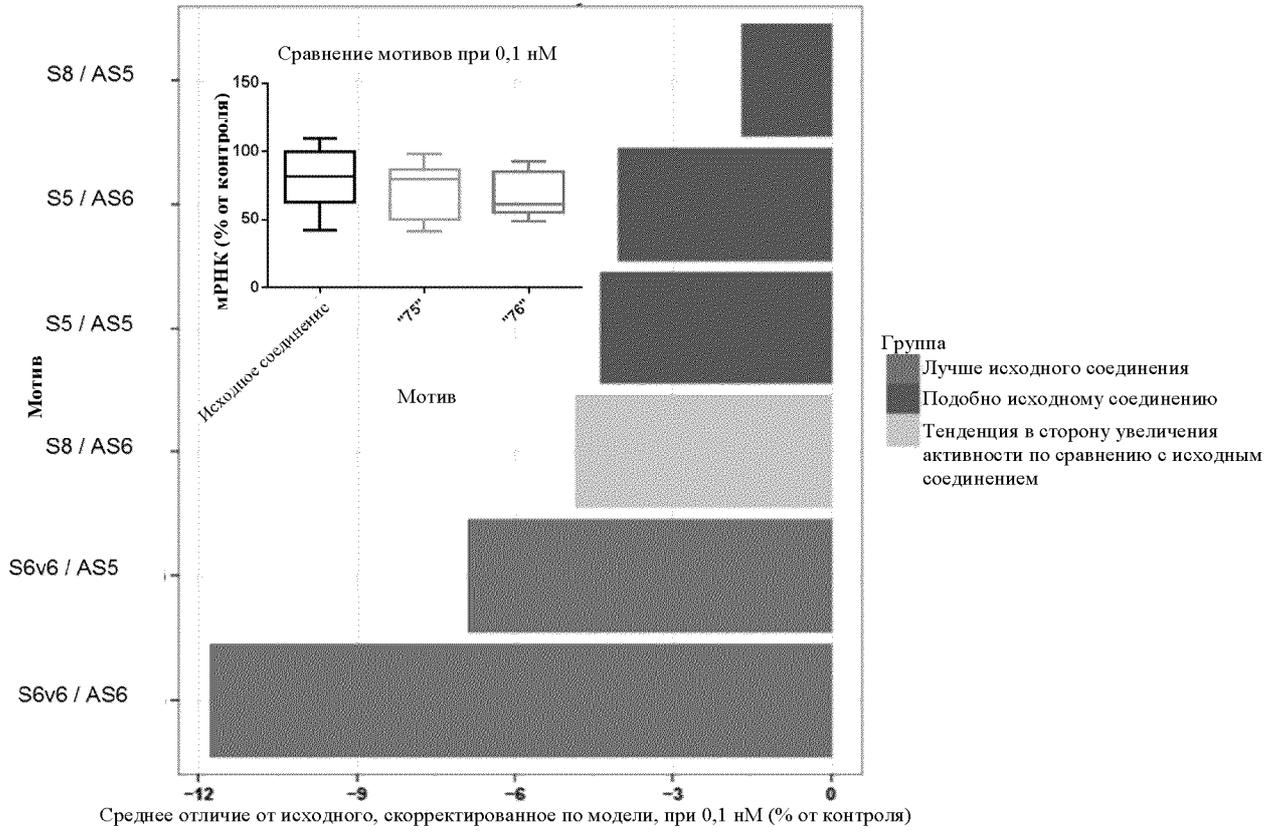
Фигура 7



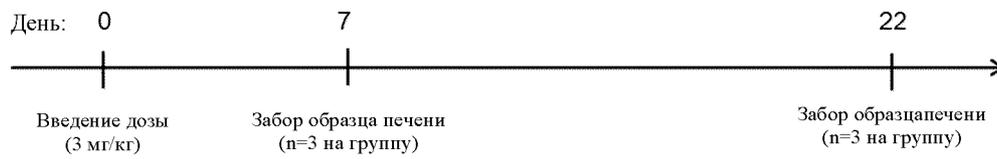
Фигура 8



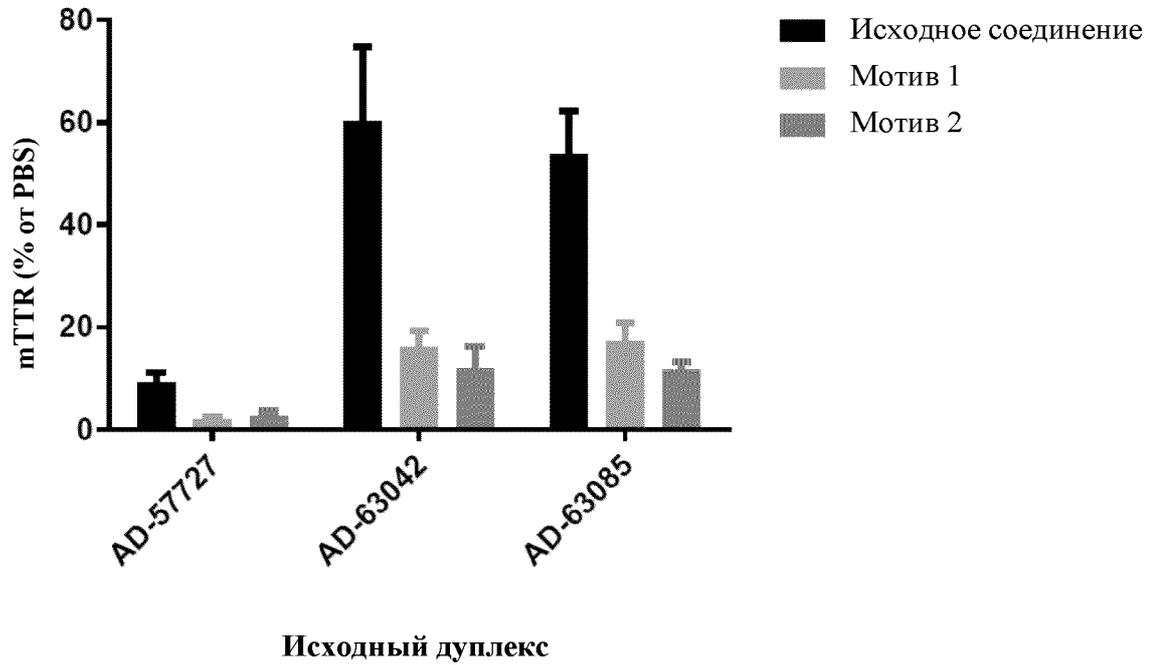
Фигура 9



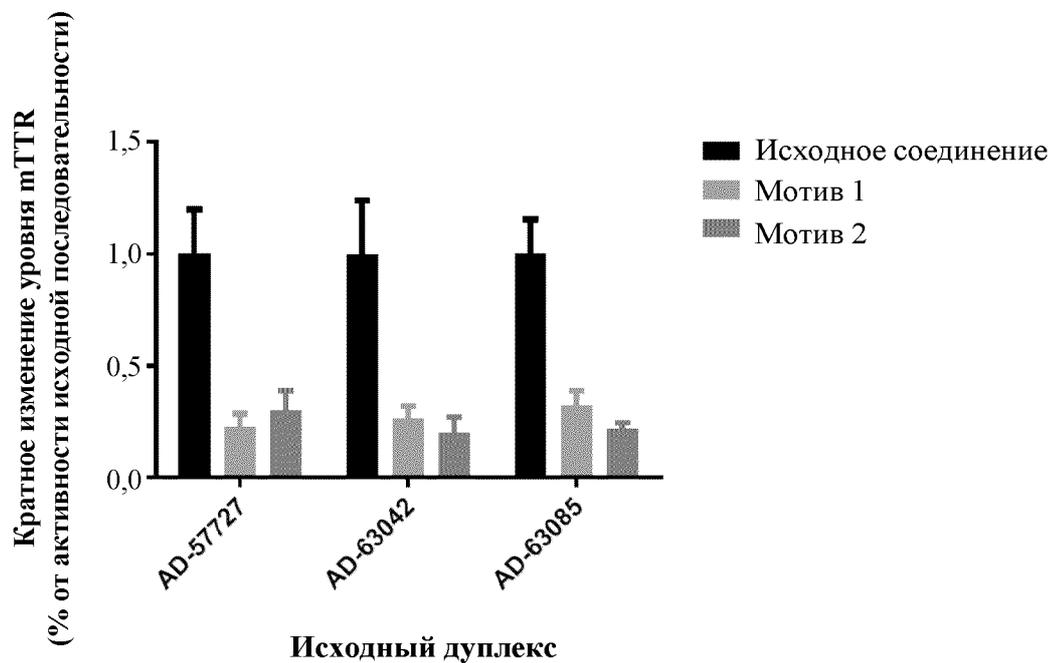
Фигура 10



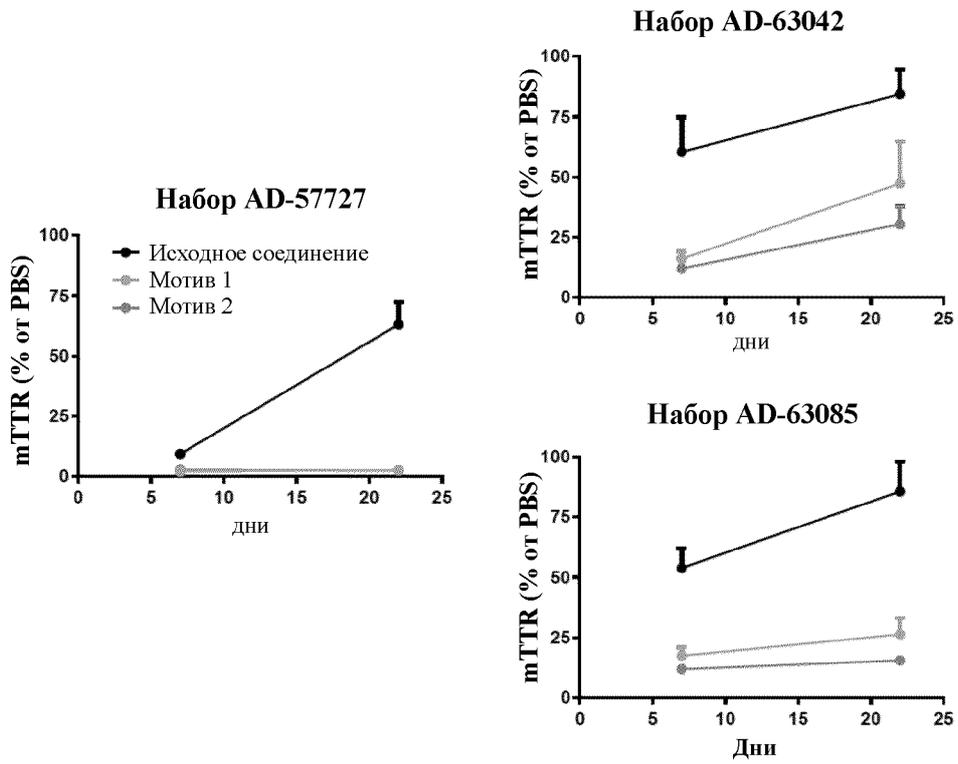
Фигура 11



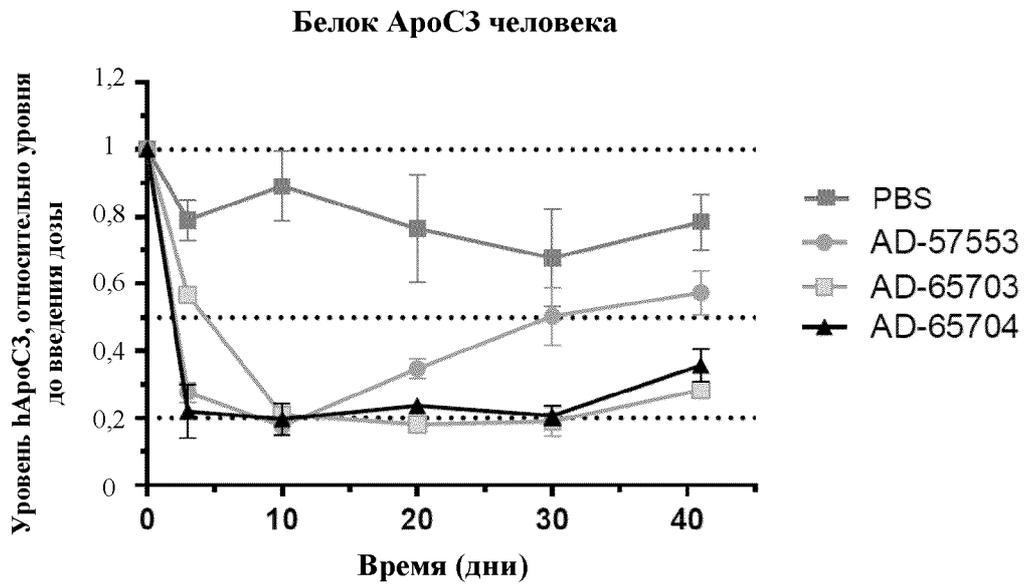
Фигура 12



Фигура 13

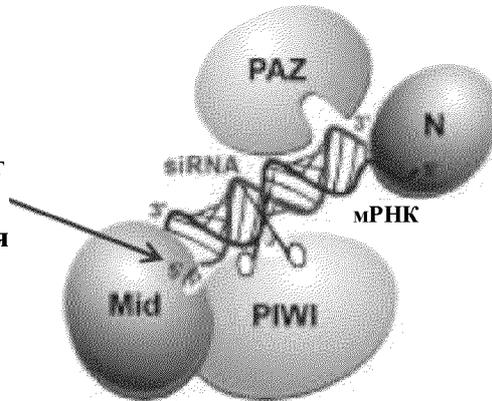


Фигура 14

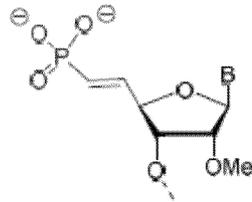


Фигура 15

5'-фосфат,
добавляемый
цитозольной
Cpr1-киназой, играет
роль ключевого
якоря для включения
в Ago2



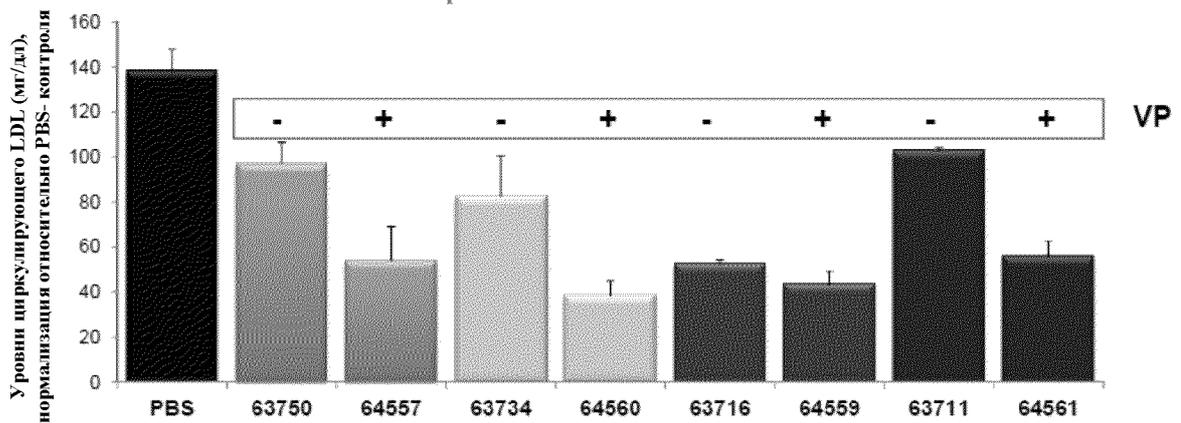
Схематическое изображение Ago2 с
включенной в него siRNA



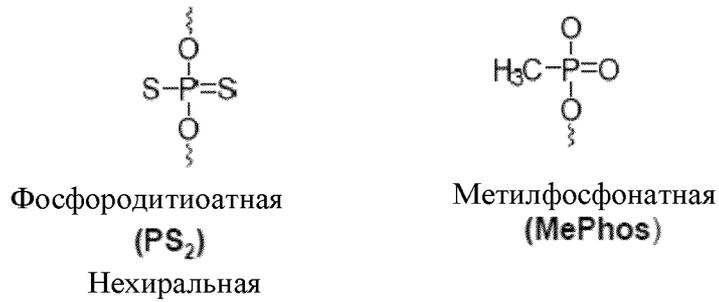
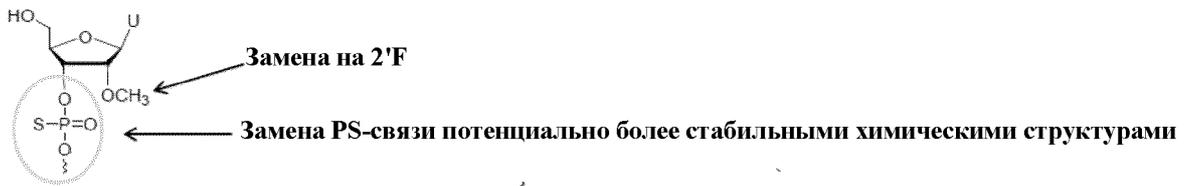
5'-винилфосфонат

Фигура 16

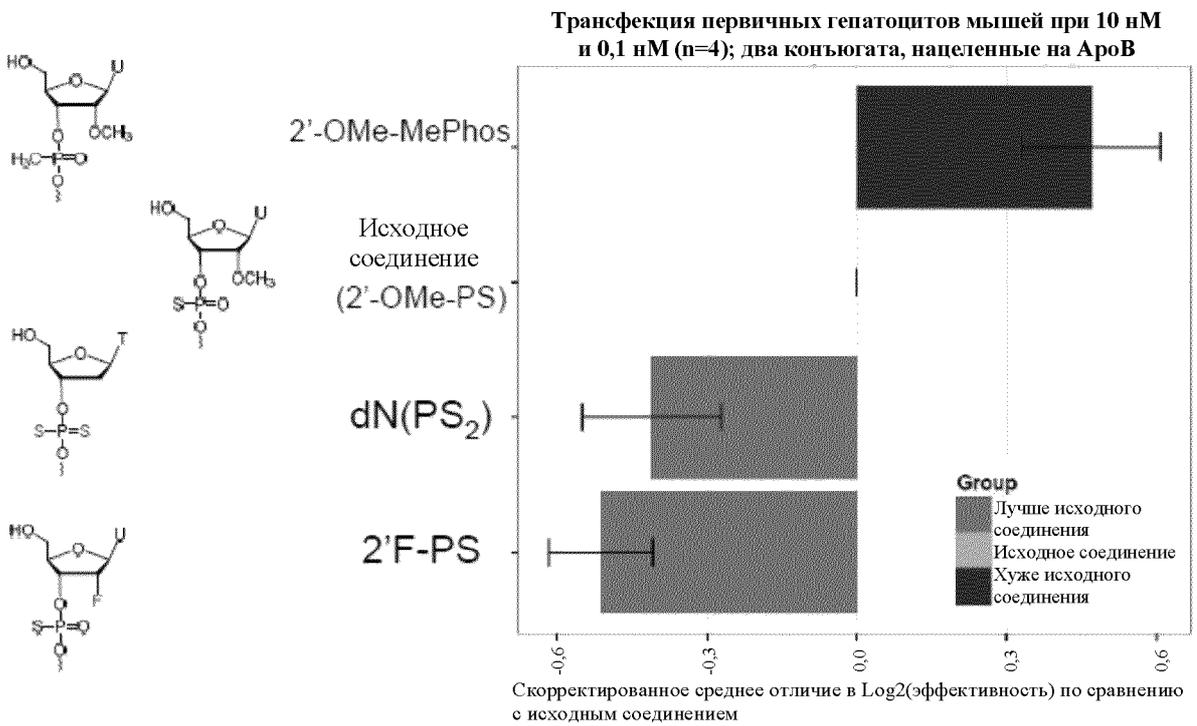
Уровни LDL через 7 дней после SC введения однократной дозы 3мг/кг;
4 пары конъюгатов +/- VP



Фигура 17



Фигура 18

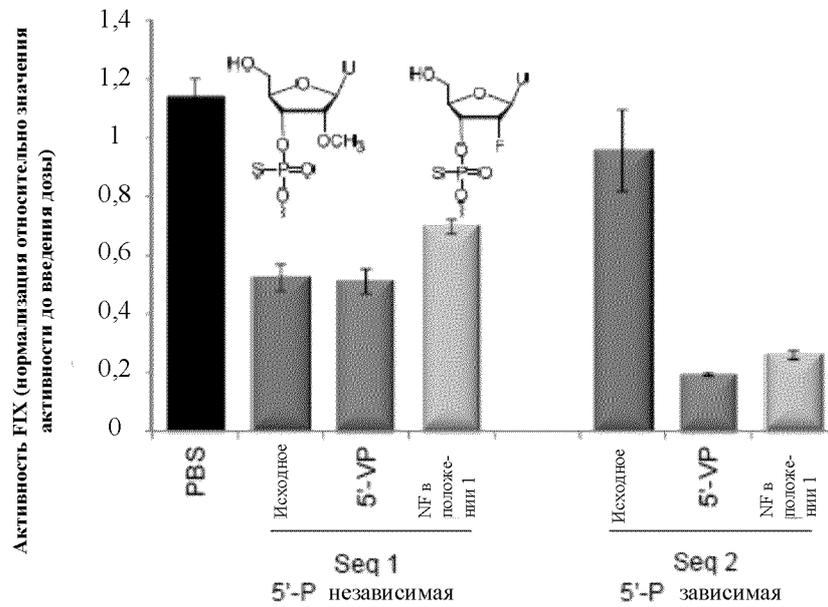


Фигура 19

A)

Nf в пол. 1 AS

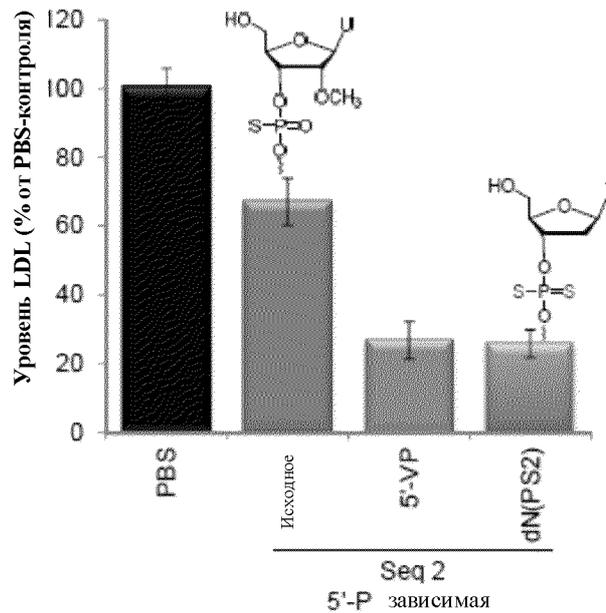
SC введение однократной дозы 3 мг/кг; активность F9 в день 3



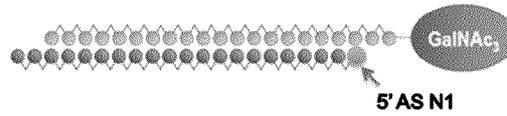
B)

dN(PS₂)

SC введение однократной дозы 10 мг/кг; уровень LDL в день 3 (АроВ)



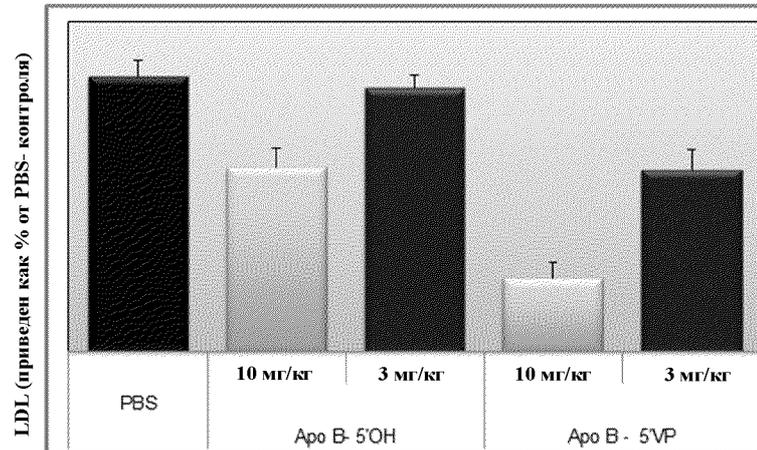
Фигура 20



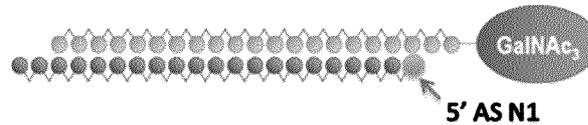
A) *In vitro* трансфекция гепатоцитов мыши 1⁰

5' AS N1	IC50 (нМ)
<p>5'-OH</p>	7,23
<p>5'-VP</p>	0,97

B) Уровни LDL через 3 дня после SC введения однократной дозы



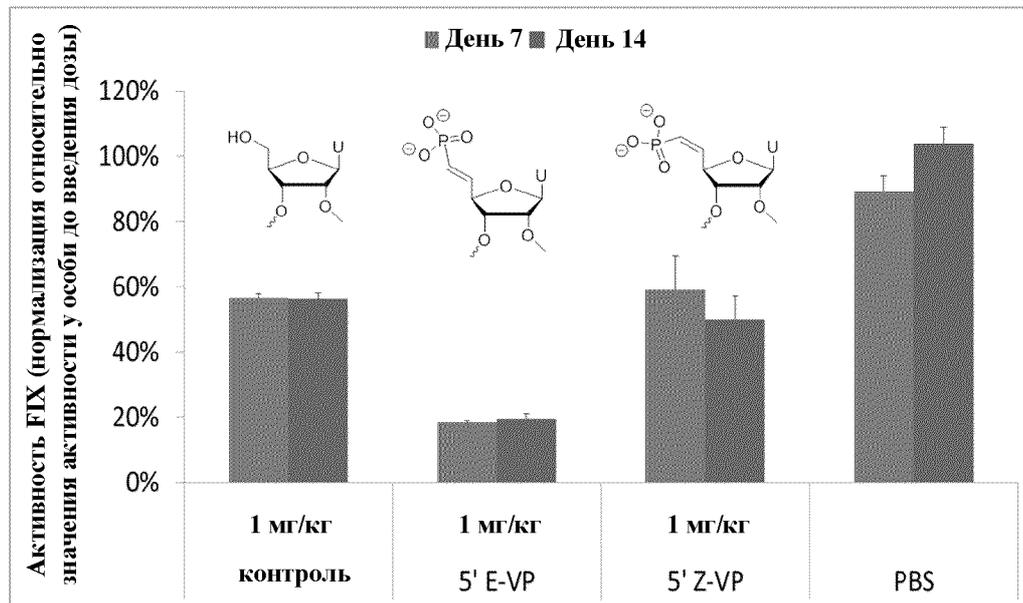
Фигура 21



5'-AS N1	IC50 (нМ)	
	mTTR	FIX
<p>5' OH</p>	0,06	0,091
<p>5' E-VP</p>	0,035	0,042
<p>5' Z-VP</p>	0,153	0,342

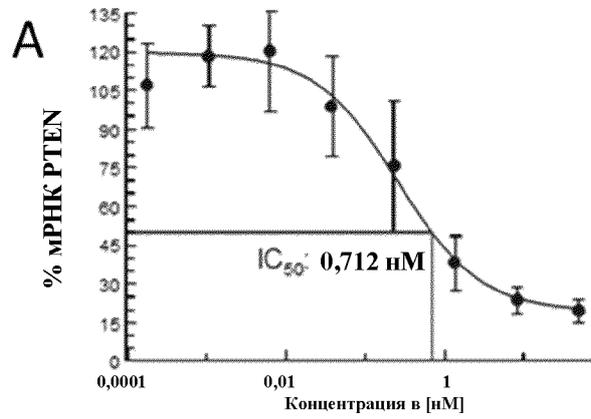
Фигура 22

Конъюгат siRNA-GalNAc, нацеленный на F9, SC введение однократной дозы

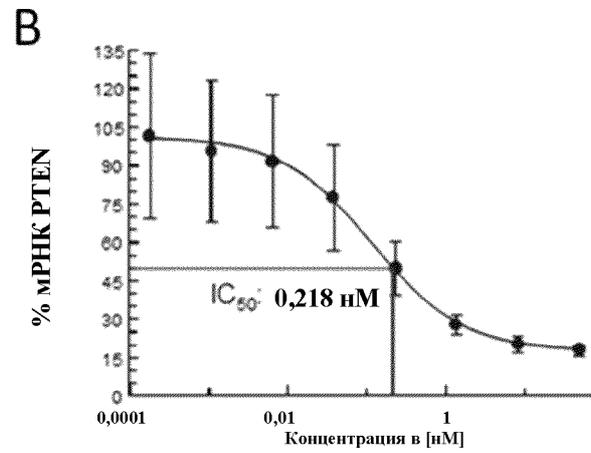


Фигура 23

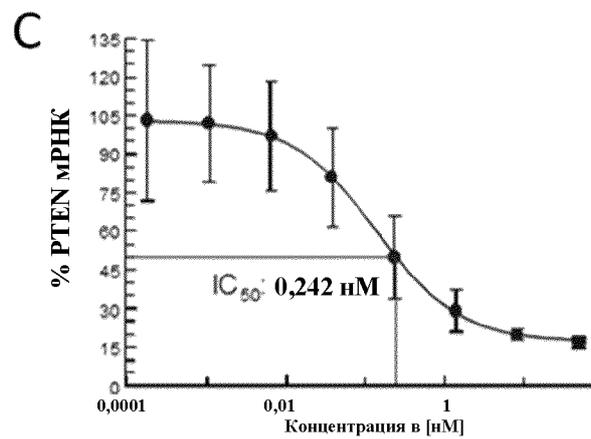
14/18



siRNA с 5'-ОН

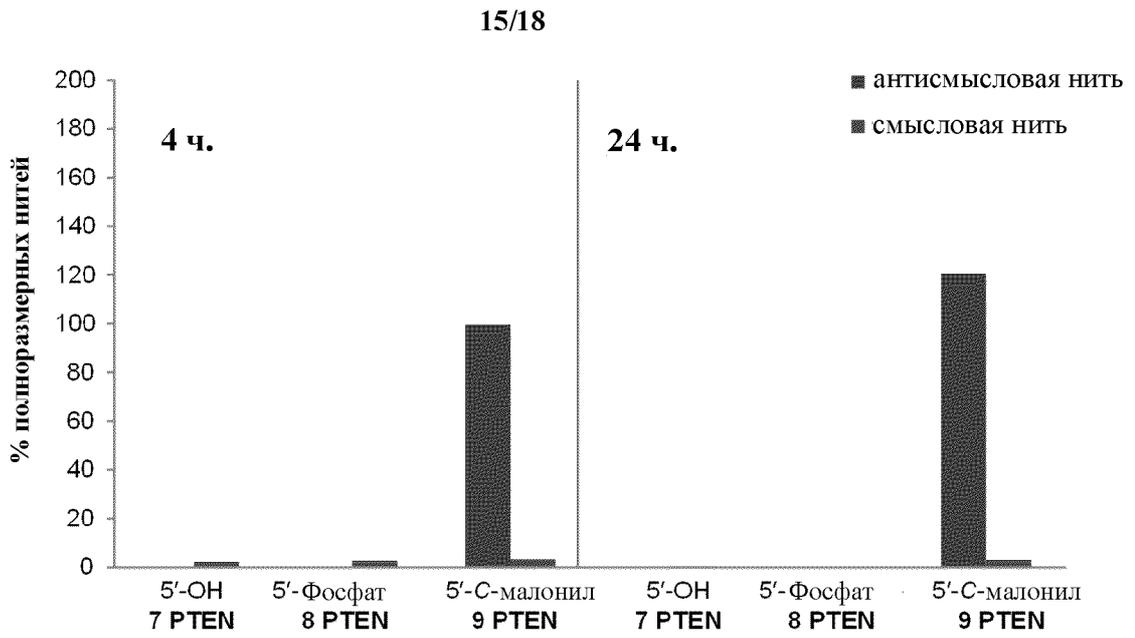


siRNA с 5'-C-малонилом

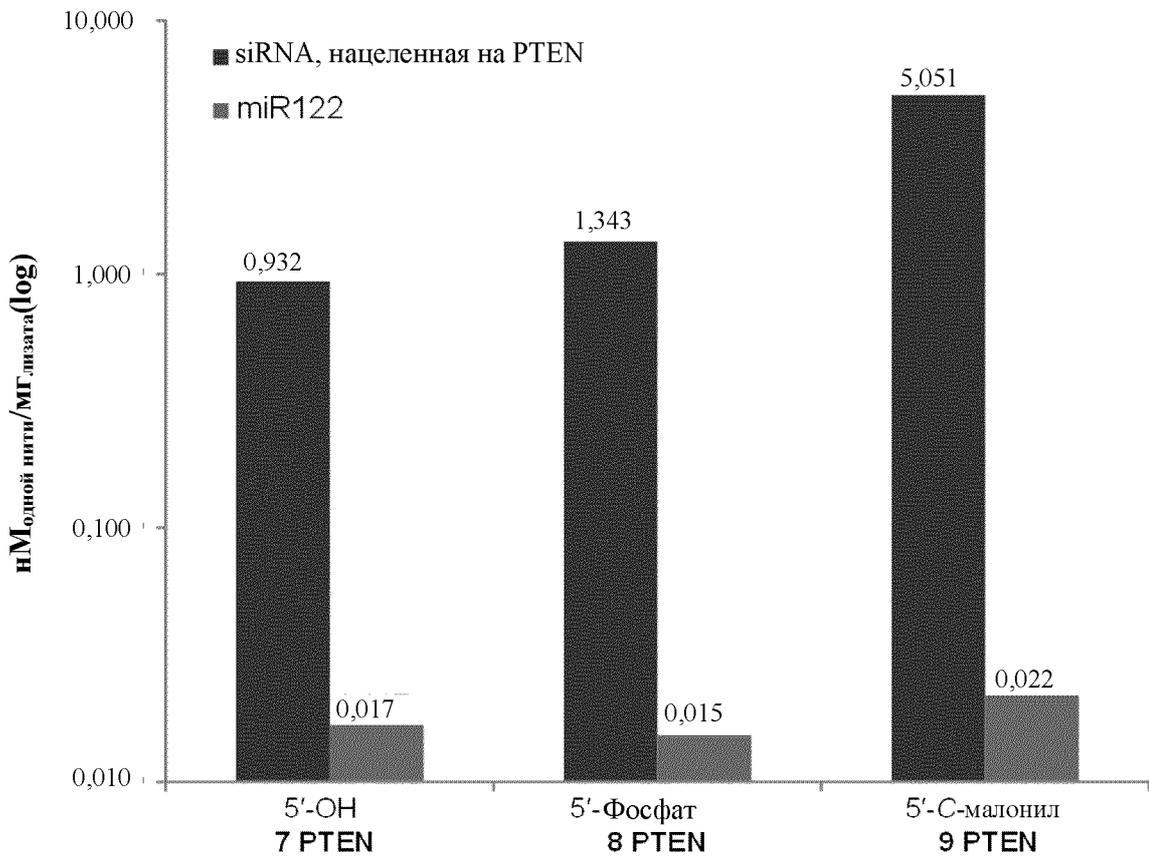


siRNA с 5'-фосфатом

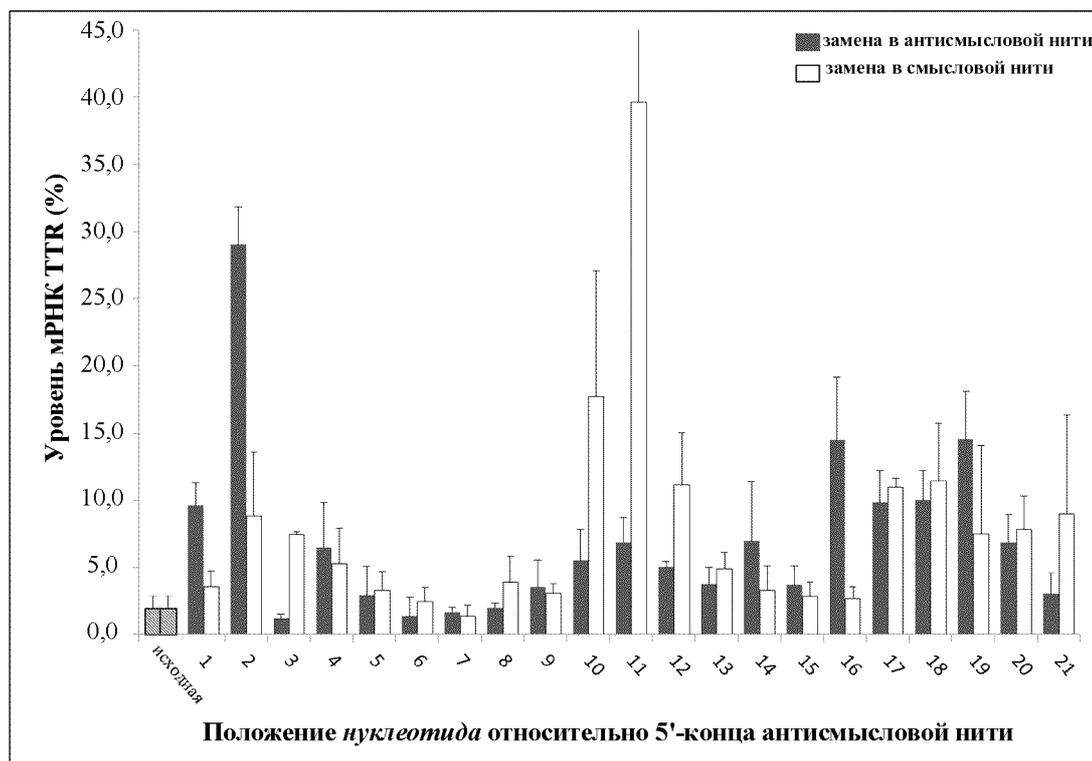
Фигура 24



Фигура 25

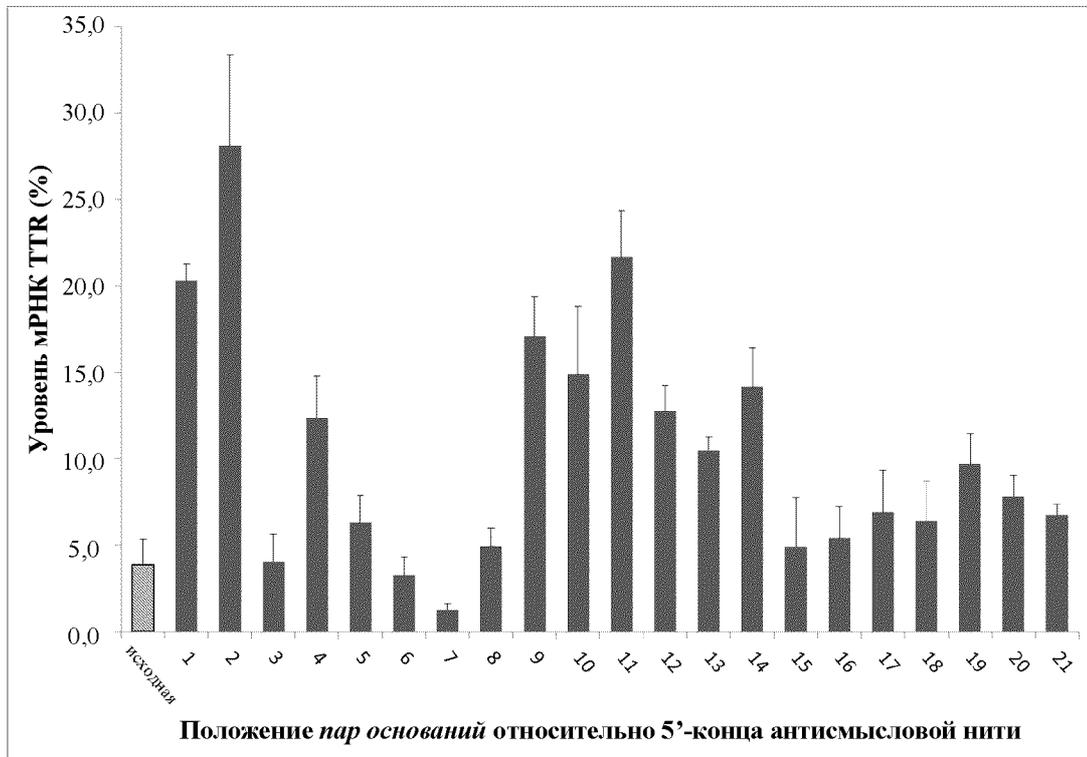


Фигура 26

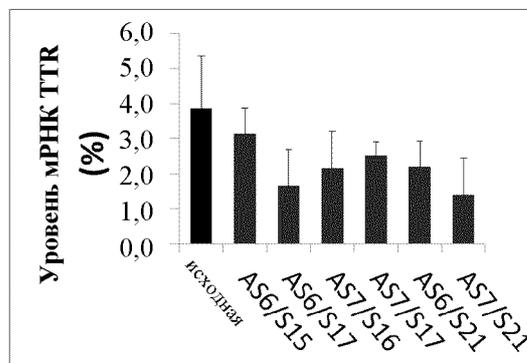


Фигура 27

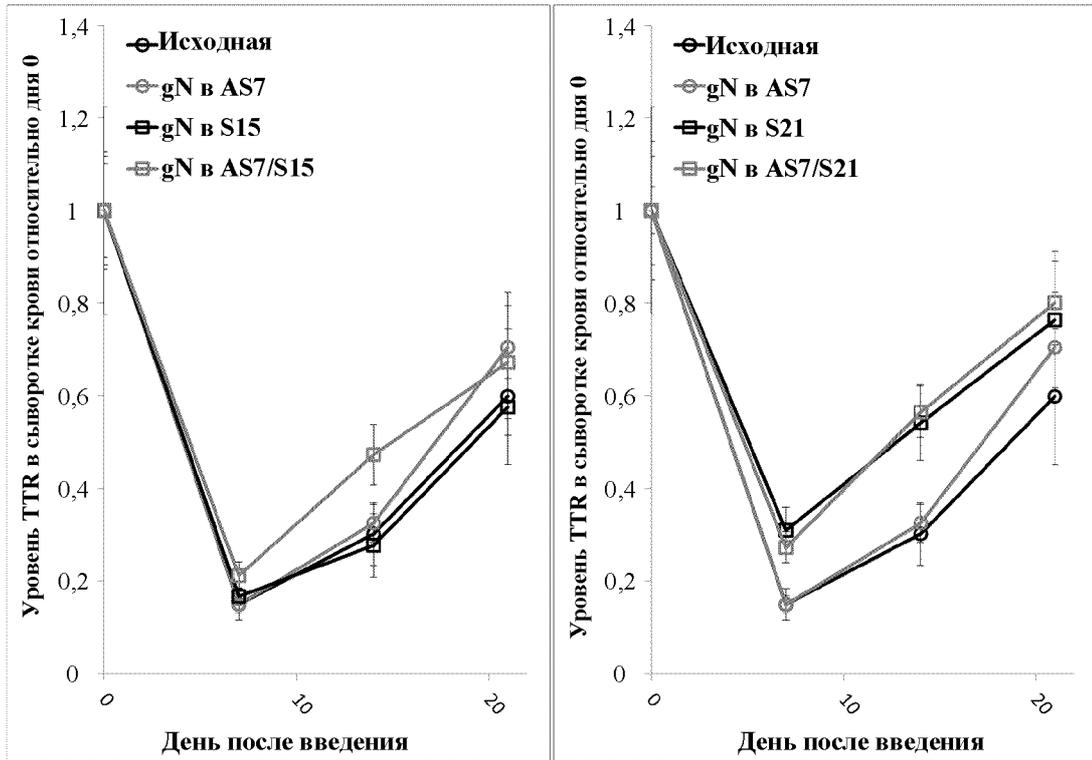
A)



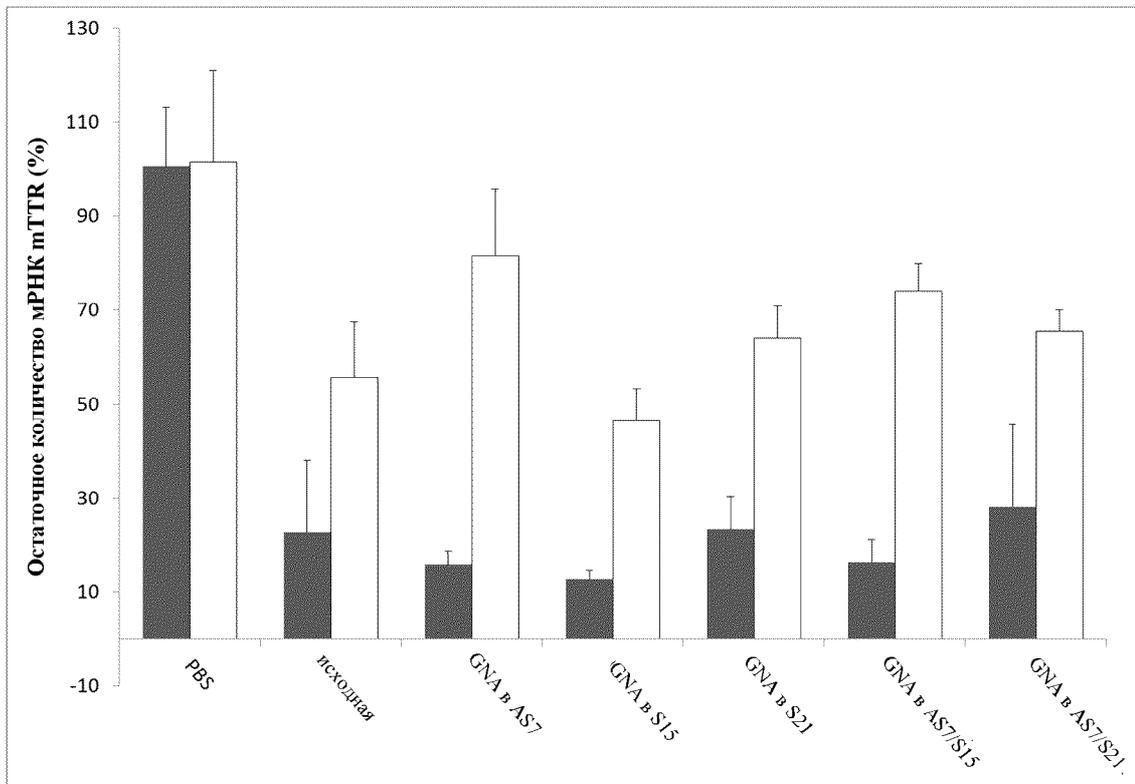
B)



Фигура 28



Фигура 29



Фигура 30

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:
202390261

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 15/113, 15/00, C07H 21/00, A61K 31/00, A61P 43/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2013/074974 A2 (ALNYLAM PHARMATEUTICALS, INC.) 23.05.2013	1-31
Y	CHOUNG Sorim et al. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. Biochemical and Biophysical Research, 2006, v. 342: 919-927, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.049, страница 924, фигура 4А, соединения 4, 5	1-31
A	BRAMSEN Jasper B. et al. A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. Nucleic Acids Research, 2009, v. 37(9): 2867-2881 doi:10.1093/nar/gkp106	1-31
A	WO 2010/011895 A1 (ALNYLAM PHARMATEUTICALS, INC. et al.) 28.01.2010	1-31
A	WO 2011/109427 A2 (ALNYLAM PHARMATEUTICALS INC. et al.) 09.09.2011	1-31
A	LAURSEN Maria B. et al. Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo. Molecular BioSystems, 2010, v. 6: 862-870 doi: 10.1039/b918869j	1-31
A	BASS B.L. How Does RNA Editing Affect dsRNA-mediated Gene Silencing? Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 2006, v. 71: 285-292 doi:10.1101/sqb.2006.71.037	1-31

последующие документы указаны в продолжении

<p>* Особые категории ссылочных документов: «А» - документ, определяющий общий уровень техники «D» - документ, приведенный в евразийской заявке «Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее «O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"</p>	<p>«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения «Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности «У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории «&» - документ, являющийся патентом-аналогом «L» - документ, приведенный в других целях</p>
--	--

Дата проведения патентного поиска: 15 сентября 2023 (15.09.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Документ подписан
электронной подписью

Сертификат: 1683140433539
Владелец: С.Н.Аверкиев С.
Действителен: 03.05.2023-02.05.2024

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390261

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 43/00 (2005.12)