

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392722 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.28

(54) КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА «РНК ПРОТИВ ХАНТИНГТИНА (НТТ) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/167,140

(32) 2021.03.29

(33) US

(86) PCT/US2022/022093

(87) WO 2022/212231 2022.10.06

(88) 2022.12.22

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

(72) Изобретатель:

Соундарапандиан Мангала Минакши,
Макининч Джеймс Д., Шлегель
Марк К., Касторено Адам (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к агентам на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНКи) и композициям, нацеленным на ген хантингтина (НТТ), а также способам ингибирования экспрессии гена НТТ и способам лечения субъектов, имеющих связанное с НТТ заболевание или расстройство, например болезнь Хантингтона, с применением таких агентов на основе дцРНКи и композиций.

A1

202392722

202392722

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579269ЕА/081

КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА ИРНК ПРОТИВ ХАНТИНГТИНА (НТТ) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета в соответствии с предварительной заявкой США № 63/167140, поданной 29 марта 2021 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и содержание которого полностью включено посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 22 марта 2022 г., названа 121301_14420_SL.txt и имеет размер 198616 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Хантингтона представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, характеризующееся двигательными нарушениями, потерей когнитивных функций и психическими проявлениями (Martin and Gusella (1986) *N. Engl. J. Med.* 315:1267-1276). Она наследуется по аутосомно-доминантному типу и поражает примерно 1/10000 индивидуумов в большинстве популяций европейского происхождения (Harper, P. S. *et al.*, в *Huntington's Disease*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1991). Отличительной чертой болезни Хантингтона является характерное хореическое двигательное расстройство, которое, как правило, имеет малозаметное, бессимптомно развивающееся начало на четвертом-пятом десятилетии жизни и постепенно ухудшается в течение 10-20 лет до смерти. Иногда болезнь Хантингтона развивается у подростков, как правило, проявляясь более тяжелыми симптомами, включая ригидность и более быстрое течение. Начало болезни Хантингтона в подростковом периоде связано с преобладанием передачи по отцовской линии через патологический аллель. Нейропатология болезни Хантингтона также демонстрирует характерную картину с селективной потерей нейронов, которая является наиболее тяжелой в областях хвостатого ядра и путамена головного мозга.

Было показано, что болезнь Хантингтона вызывается распространяющимся повтором глутамина в экзоне 1 гена, называемого IT15 или хантингтином (НТТ). Несмотря на то, что этот ген широко экспрессируется и необходим для нормального развития, патология болезни Хантингтона ограничена головным мозгом по причинам, которые остаются недостаточно понятными. У пациентов с HD (аутосомно-доминантным заболеванием) распространение полиглутаминового повтора приводит к образованию транскрипта дикого типа, полноразмерного мутантного транскрипта, имеющего распространившийся полиглутаминовый повтор, а также усеченного мутантного транскрипта, имеющего распространившийся полиглутаминовый повтор. Было показано, что, хотя продукт гена хантингтина экспрессируется со сходными уровнями у пациентов и контролей, именно распространение полиглутаминового повтора и наличие

полноразмерного мутантного транскрипта и усеченного мутантного транскрипта индуцирует токсичность.

Эффективное лечение болезни Хантингтона в настоящее время недоступно. Хореические движения и возбужденное поведение могут быть подавлены, обычно только частично, с помощью антипсихотиков (например, хлорпромазина) или резерпина до тех пор, пока не возникнут нежелательные эффекты вялости, гипотонии или паркинсонизма. Кроме того, несмотря на значительные достижения в области РНКи (РНК-интерференции) и лечения болезни Хантингтона, остается потребность в агенте, который может селективно и эффективно подавлять ген HD с использованием собственного аппарата РНКи клетки, который обладает как высокой биологической активностью, так и стабильностью *in vivo*, и который может эффективно ингибировать экспрессию целевого гена хантингтина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции агента РНКи, которые влияют на опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена хантингтина (НТТ). Ген НТТ может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения композиций агента РНКи согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена НТТ или для лечения субъекта, который получит пользу от ингибирования или снижения экспрессии гена НТТ, например, субъекта, страдающего или склонного к развитию связанного с НТТ заболевания.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей НТТ, и при этом указанная область комплементарности содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 4391-4669; 6500-6540; или 6009-6037 из SEQ ID NO:1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 4398-4420; 4403-4425 или 6512-6534 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 4398-4420 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1271085, AD-1271083 или AD-1271084.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1271085.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 15).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 15).

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16).

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 15).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 15), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 15), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 26-77; или 142-202 из SEQ

ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности нуклеотидов 27-49; 55-77; 147-169 или 173-195 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 147-169 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи дуплекса, выбранной из группы, состоящей из AD-1019448, AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1498524.

Смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь могут быть конъюгированы с одним или более липофильными фрагментами. Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области агента на основе дцРНК, например, один или более липофильных фрагментов могут быть конъюгированы с одним или более внутренними положениями на антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи посредством линкера или носителя.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильность липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, превышает 0.

Согласно некоторым вариантам реализации гидрофобность агента на основе дцРНК, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови агента на основе дцРНК, превышает 0,2. Согласно некоторым вариантам реализации анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

Согласно некоторым вариантам реализации внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца смысловой цепи или антисмысловой цепи. Согласно другим вариантам реализации внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца смысловой цепи или антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи, например, внутренние положения включают

все положения, за исключением положений 9-12, отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи, или внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13, отсчитывая от 3'-конца смысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи. Согласно другим вариантам реализации внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой нити. Согласно некоторым вариантам реализации внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, отсчитывая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи и положений 15 и 17 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину, антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину, и липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

Согласно другим вариантам реализации смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину, антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину, и липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеоил)литохолевой кислоты, О3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент содержит

насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь. Согласно некоторым вариантам реализации насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована в положении 6, отсчитывая от 5'-конца цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(положениях) или двухцепочечной области. Согласно некоторым вариантам реализации носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент на основе сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент конъюгирован с агентом на основе дцРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды. Согласно другим вариантам реализации все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из следующей группы: дезоксинуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-модифицированный нуклеотид, блокированный нуклеотид, неблокированный нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, ограниченный этилнуклеотид, нуклеотид без азотистого основания, 2'-амин-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидрокси-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолиновый нуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий неприродное

основание, тетрагидропиран-модифицированный нуклеотид, 1,5-ангидрогекситол-модифицированный нуклеотид, циклогексенил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотид, содержащий винилфосфонат, нуклеотид, содержащий аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотид, содержащий S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотид, содержащий 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотид, содержащий 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты, и их комбинации.

Согласно другим вариантам реализации модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксидеокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидеокси-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), блокированного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидеокси-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна из модификаций на нуклеотидах представляет собой термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая нуклеотидная модификация выбрана из группы, состоящей из модификации лишенным азотистого основания нуклеотидом; несовпадения с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксидеокси-модификации, ациклического нуклеотида, неблокированных нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA)

Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

Согласно некоторым вариантам реализации модификации на нуклеотидах представляют собой модификации 2'-О-метил, GNA и 2'-фтор.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Согласно одному варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь. В связанном варианте реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь. Согласно другому варианту реализации фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи. Необязательно указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. Согласно другому варианту реализации указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

Согласно некоторым вариантам реализации каждая цепь представляет собой не более 30 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида или 3'-липкий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

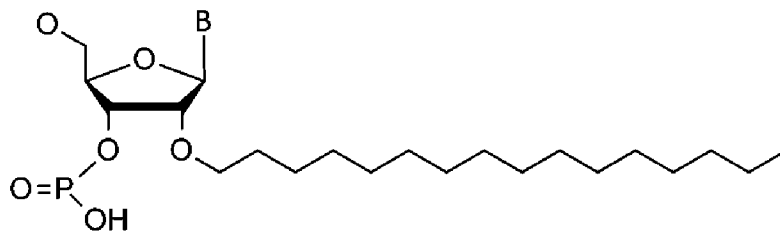
Двухцепочечная область может иметь 15-30 нуклеотидных пар в длину; 17-23 нуклеотидные пары в длину; 17-25 нуклеотидных пар в длину; 23-27 нуклеотидных пар в длину; 19-21 нуклеотидную пару в длину; 21-23 нуклеотидные пары в длину.

Каждая цепь может представлять собой 19-30 нуклеотидов; 19-23 нуклеотида или 21-23 нуклеотида.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc. Согласно другим вариантам реализации агент на основе дцРНК не содержит нацеливающего лиганда, который нацелен на ткань печени, такого как конъюгат GalNAc.

Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечный агент РНКи дополнительно включает нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, опосредующий доставку в ткань ЦНС, например, гидрофильный лиганд.

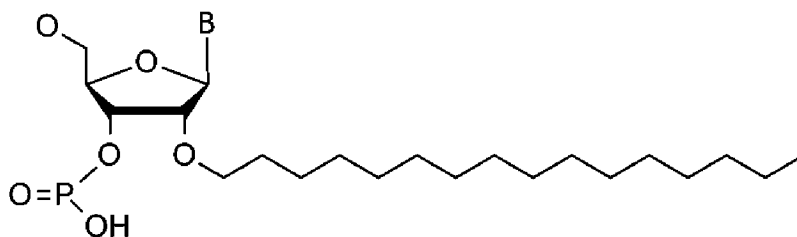
Согласно определенным вариантам реализации нацеливающий лиганд представляет собой С16 лиганд. Согласно одному варианту реализации лиганд представляет собой



где В представляет собой нуклеотидное основание или аналог нуклеотидного основания, где В необязательно представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно

включает нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, опосредующий доставку в ткань ЦНС, например, гидрофильный лиганд, такой как C16 лиганд, например,



где В представляет собой нуклеотидное основание или аналог нуклеотидного основания, где В необязательно представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил и не содержит нацеливающего лиганда, который нацелен на ткань печени, такого как конъюгат GalNAc.

Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам реализации 3'-конец смысловой цепи защищен посредством концевой кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнауклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнауклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнауклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнауклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнауклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнауклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

Согласно некоторым вариантам реализации пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3' (SEQ ID NO: 40).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную

последовательность 5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3' (SEQ ID NO: 40), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO: 57).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO: 44).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO: 44), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO: 57).

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO: 59).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 46).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 46), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO: 59).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (HTT) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U; (Chd) представляет собой 2'-О-гексадецилцитозин-3'-фосфат; C2p представляет собой цитидин-2'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной

последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (HTT) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, C, G и U; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; Tgn представляет собой S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA); и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной

последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (HTT) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85), где а, г, с и и представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, C, G и U; (Chd) представляет собой 2'-О-гексадецилцитозин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен двухцепочечный агент РНКи для ингибирования экспрессии гена хантингтина (HTT) в клетке, причем указанный двухцепочечный агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 последовательный нуклеотид, отличающийся не более чем 3 нуклеотидами (т. е. отличающийся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUCGA-3' (SEQ ID NO: 15), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 последовательных нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами (т. е. отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16), при этом по существу все, например, не менее 18, 19, 20 или 21, из нуклеотидов смысловой цепи и по существу все, например, не менее 20, 21, 22 или 23, из нуклеотидов антисмысловой цепи содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации, и 2'-О-гексадецил-модификации, при этом указанный агент на основе дцРНК содержит от шести до восьми фосфотиоатных межунауклеотидных связей, при этом указанная смысловая цепь содержит одну или более винилфосфонатных (VP) модификаций, например, одиночную модификацию VP на 5'-конце антисмысловой цепи, и при этом указанный агент на основе дцРНК не содержит лиганда, нацеливающего на ткань печени, например, лиганда GalNAc.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК содержит восемь фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

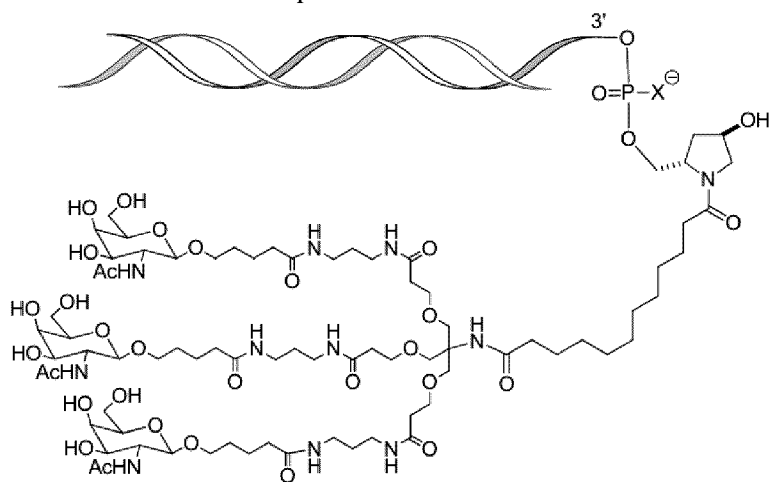
Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен двухцепочечный агент РНКи для ингибирования экспрессии гена хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный двухцепочечный агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 21 последовательный нуклеотид, отличающийся не более чем 3 нуклеотидами (т. е. отличающийся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUCGA-3' (SEQ ID NO: 15), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 последовательных нуклеотида, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами (т. е. отличающихся на 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов) от нуклеотидной последовательности 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16), при этом по существу все, например, не менее 18, 19, 20, или 21, из нуклеотидов смысловой цепи и по существу все, например, не менее 20, 21, 22, или 23, из нуклеотидов антисмысловой цепи содержат нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации, 2'-фтор-модификации, и 2'-О-гексадецил-модификации, при этом указанная смысловая цепь содержит четыре фосфотиоатные межнуклеотидные связи, например, две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и при этом указанная антисмысловая цепь содержит четыре фосфотиоатные межнуклеотидные связи, например, две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и при этом указанная смысловая цепь содержит одну или более винилфосфонатных (VP) модификаций, например, одиночную модификацию VP на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно другому варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO: 17), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO: 18), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе)-модифицированный А, С, G и U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированный А, С, G и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой винилфосфонат. Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд, такой как N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканол]-4-гидроксипролинол.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO: 17), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO: 18), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе)-модифицированный А, С, G и U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированный А, С, G и U, соответственно; s

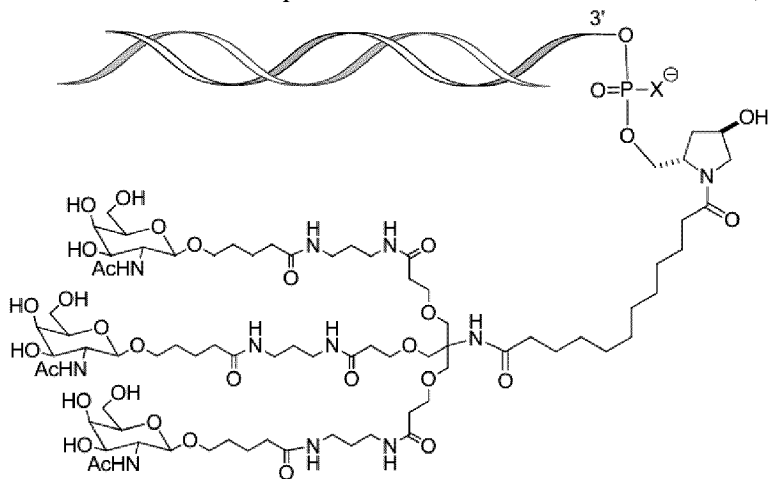
представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой винилфосфонат. Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд, такой как N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол.

Согласно другому варианту реализации смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO: 17), и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO: 18), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОMe)-модифицированный А, С, G и U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированный А, С, G и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой винилфосфонат, и при этом лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой О.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO: 17), и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO: 18), где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОMe)-модифицированный А, С, G и U, соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированный А, С, G и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; и VP представляет собой винилфосфонат, и при этом лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой О.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U, соответственно; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С и U, соответственно; dG и dT представляют собой 2'-дезоксигуанидин и тимин, соответственно; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную

последовательность 5'-usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGfaugaaggcscsa-3' (SEQ ID NO:23), и указанная антисмысловая цепь содержит модифицированную нуклеотидную последовательность 5'-VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg-3' (SEQ ID NO:24), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U, соответственно; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; (Tgn) представляет собой S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA); и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U, соответственно; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22), где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U, соответственно; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18), где а, g, с и u представляют

собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Uf представляют собой 2'-фтор A, C, и U, соответственно; dG и dT представляют собой 2'-дезоксигуанидин и тимин, соответственно; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилгуанидин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGfaugaaggcscsa-3' (SEQ ID NO:23), и указанная антисмысловая цепь состоит из модифицированной нуклеотидной последовательности 5'-VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg-3' (SEQ ID NO:24), где a, g, c и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U, соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; (Tgn) представляет собой S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA); и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены клетки, содержащие любой из агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, и фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена, кодирующего НТТ, содержащие любой из агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНК находится в незабуференном растворе. Необязательно незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду. Согласно другому варианту реализации двухцепочечный агент РНК находится в буферном растворе. Необязательно буферный раствор включает ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. Согласно другому варианту реализации буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, которая включает двухцепочечный агент РНК согласно настоящему изобретению и липидный состав. Согласно одному варианту реализации липидный состав включает липидную наночастицу (LNP).

Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая два или более агентов на основе дцРНК для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, таких как первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая два или более агентов на основе дцРНК для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом

каждая из указанных антисмысловых цепей независимо содержит область комплементарности мРНК, кодирующей НТТ, и при этом каждая из указанных областей комплементарности независимо содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая два или более агентов на основе дцРНК для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом каждая из указанных смысловых цепей независимо содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 4391-4669; 6500-6540; или 6009-6037 из SEQ ID NO: 1, и каждая из указанных антисмысловых цепей независимо содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

Согласно одному варианту реализации каждая смысловая цепь независимо содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 4398-4420; 4403-4425 или 6512-6534 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации одна смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 4398-4420 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации каждая антисмысловая цепь содержит независимо по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1271085, AD-1271083 или AD-1271084.

Согласно одному варианту реализации одна антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1271085.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая два или более агентов на основе дцРНК для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке, причем каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом каждая из указанных смысловых цепей независимо содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 26-77; или 142-202 из SEQ ID NO: 1, и каждая из указанных антисмысловых цепей независимо содержит нуклеотидную последовательность,

содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

Согласно одному варианту реализации каждая смысловая цепь независимо содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 27-49; 55-77; 147-169 или 173-195 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации одна смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 147-169 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации каждая антисмысловая цепь независимо содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1019448; AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528.

Согласно одному варианту реализации одна антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1498524.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна из указанных смысловых цепей или по меньшей мере одна из указанных антисмысловых цепей независимо конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному варианту реализации все смысловые цепи или все антисмысловые цепи каждого из агентов на основе дцРНК независимо конъюгированы с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному варианту реализации каждый липофильный фрагмент независимо конъюгирован с одним или более положениями в двухцепочечной области агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации каждый липофильный фрагмент независимо конъюгирован посредством линкера или носителя.

Согласно одному варианту реализации липофильность каждого липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, независимо превышает 0.

Согласно одному варианту реализации гидрофобность каждого двухцепочечного агента РНКи, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови двухцепочечного агента РНКи, независимо превышает 0,2.

Согласно одному варианту реализации анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

Согласно одному варианту реализации каждый из агентов на основе дцРНК независимо содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации каждая смысловая цепь и каждая антисмысловая цепь каждого агента на основе дцРНК независимо содержит не более пяти

немодифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды каждой смысловой цепи и все нуклеотиды каждой антисмысловой цепи независимо содержат модификацию.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, 2'-О-гексадецилового нуклеотида, нуклеотида, содержащего 2'-фосфат, цитидин-2'-фосфатного нуклеотида, гуанозин-2'-фосфатного нуклеотида, 2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфатного нуклеотида, 5'-винилфосфоната (VP), 2'-дезоксиаденозин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-дезоксцитидин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-дезокситимидин-3'-фосфатного нуклеотида, 2'-деоксиуридинового нуклеотида, и концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации модифицированный нуклеотид независимо выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), блокированного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

Согласно другому варианту реализации модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

Согласно одному варианту реализации каждая из модификаций на нуклеотидах независимо выбрана из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификаций, 2'-дезоксимо модификаций или 2'-фтор-модификаций.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из агентов на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из агентов на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь каждого агента на основе дцРНК независимо представляет собой не более 30 нуклеотидов в длину.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна цепь по меньшей мере одного агента на основе дцРНК независимо содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь по меньшей мере одного агента на основе дцРНК независимо содержит 3'-липкий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

Двухцепочечная область каждого агента на основе дцРНК может независимо составлять 15-30 нуклеотидных пар в длину; 17-23 нуклеотидные пары в длину; 17-25 нуклеотидных пар в длину; 23-27 нуклеотидных пар в длину; 19-21 нуклеотидную пару в длину или 21-23 нуклеотидные пары в длину.

Каждая цепь каждого агента на основе дцРНК может независимо содержать 19-30 нуклеотидов; 19-23 нуклеотида в длину; или 21-23 нуклеотида в длину.

Согласно одному варианту реализации каждый агент на основе дцРНК содержит один или более липофильных фрагментов, независимо конъюгированных с одним или более внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из одного или более липофильных фрагментов независимо конъюгирован с одним или более внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи посредством линкера или носителя.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо включает все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо включает все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо исключает область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо включает все положения, за исключением положений 9-12, отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений

независимо включает все положения, за исключением положений 11-13, отсчитывая от 3'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо исключает область сайта расщепления антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо включает все положения, за исключением положений 12-14, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из внутренних положений независимо включает все положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, отсчитывая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации каждый из одного или более липофильных фрагментов независимо конъюгирован с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно одному варианту реализации один или более липофильных фрагментов независимо конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи и положений 15 и 17 на антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждое из положений в двухцепочечной области независимо исключает область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждая из смысловых цепей независимо представляет собой 21 нуклеотид в длину, каждая из антисмысловых цепей независимо представляет собой 23 нуклеотида в длину, и каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с положением 16 антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов

независимо выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, ОЗ-(олеоил)литохолевой кислоты, ОЗ-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

Согласно одному варианту реализации каждая насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь независимо конъюгирована в положении 6, отсчитывая от 5'-конца цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(положениях) или двухцепочечной области.

Согласно одному варианту реализации каждый из носителей независимо представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент на основе сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с двухцепочечным агентом иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов независимо конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

Согласно одному варианту реализации каждый из липофильных фрагментов или одного или более нацеливающих лигандов независимо конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации 3'-конец по меньшей мере одной смысловой цепи независимо защищен посредством концевой кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из агентов на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации каждый миметик фосфата независимо представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

Согласно одному варианту реализации каждая из смысловых цепей независимо имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и каждая из антисмысловых цепей независимо имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи представляет собой его фармацевтически приемлемую соль. «Фармацевтически приемлемые соли» каждого из агентов РНКи в настоящем документе включают, но не ограничиваются перечисленными, натриевую соль, кальциевую соль, литиевую соль, калиевую соль, аммониевую соль, магниевую соль, их смеси. Специалист в данной области техники поймет, что агент РНКи, если он предложен в виде поликатионной соли, имеет одну катионную группу на свободную кислотную группу необязательно модифицированного фосфодиэфирного остова и/или любые другие кислотные модификации (например, 5'-концевые фосфонатные группы). Например, олигонуклеотид из «n» нуклеотидов в длину содержит n-1 необязательно модифицированных фосфодиэфиров так, что олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину может быть предложен в виде соли, содержащей до 20 катионов (например, 20 катионов натрия). Аналогичным образом, агенты РНКи, имеющие смысловую цепь из 21 нуклеотида в длину и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов в длину, могут быть предложены в виде соли, содержащей до 42 катионов (например, 42 катиона натрия). В предыдущем примере, в котором агент РНКи также включает 5'-концевой фосфат или 5'-концевую винилфосфонатную группу, агент РНКи может быть предложен в виде соли, содержащей до 44 катионов (например, 44 катиона натрия).

Согласно настоящему изобретению также предложены клетки и фармацевтические композиции, содержащие композиции согласно настоящему изобретению, например, содержащие липидный состав.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии гена НТТ в клетке, причем указанный способ включает (a) приведение клетки в контакт с двухцепочечным агентом РНКи согласно настоящему изобретению, композицией согласно настоящему изобретению или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению; и (b) поддержание клетки, полученной на

этапе (а), в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена НТТ, что обеспечивает ингибирование экспрессии гена НТТ в клетке.

Согласно одному варианту реализации клетку приводят в контакт с двумя или более, например, 2, 3 или 4, агентами на основе дцРНК согласно настоящему изобретению (или композициями согласно настоящему изобретению), такими как первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ.

Согласно одному варианту реализации клетка находится в организме субъекта. Необязательно субъект представляет собой человека.

Согласно определенным вариантам реализации субъект представляет собой макаку-резуса, яванскую макаку, мышь или крысу. Согласно определенным вариантам реализации экспрессия НТТ ингибируется агентом РНКи по меньшей мере примерно на 50%.

Согласно определенным вариантам реализации у субъекта-человека диагностировано связанное с НТТ заболевание, например, болезнь Хантингтона.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано связанное с НТТ заболевание, например, болезнь Хантингтона, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного агента РНКи согласно настоящему изобретению, композиции согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что обеспечивает лечение субъекта.

Согласно одному варианту реализации субъекту вводят два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению (или композиций согласно настоящему изобретению), таких как первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ.

Первый и второй агенты на основе дцРНК могут присутствовать в одной и той же композиции или в отдельных композициях.

Первый и второй агенты на основе дцРНК могут быть введены субъекту в одно и то же время или в разные моменты времени.

Согласно одному варианту реализации лечение включает уменьшение по меньшей мере одного признака или симптома заболевания. Согласно другому варианту реализации лечение включает предотвращение прогрессирования заболевания.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту интратекально. Согласно одному варианту реализации способ обеспечивает снижение экспрессии гена НТТ в ткани головного мозга (например, стриатуме) или позвоночника. Необязательно ткань головного мозга или позвоночника представляет собой стриатум, кору головного мозга, мозжечок, шейный отдел позвоночника, поясничный отдел позвоночника

или грудной отдел позвоночника.

Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает измерение уровня НТТ в образце, полученном от субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии хантинтина (НТТ) у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного агента РНК согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что ингибирует экспрессию НТТ у указанного субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного агента, подходящего для лечения или предотвращения связанного с НТТ расстройства.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой график, отображающий нокдаун (knockdown) НТТ в указанных областях головного мозга и позвоночника приматов, отличных от человека, имеющих более 1000 нг/мл киРНК (короткой интерферирующей РНК) в СМЖ через 24 часа после интратекального введения однократной дозы 60 мг указанных дуплексов.

Фигура 2 представляет собой таблицу, отображающую ингибирование экспрессии мРНК НТТ в указанных областях головного мозга и позвоночника приматов, отличных от человека (n=5 на группу), через 24 часа после интратекального введения однократной дозы 60 мг указанных дуплексов.

Фигура 3А представляет собой график, отображающий концентрацию киРНК в СМЖ указанных приматов, отличных от человека (см. Фигуру 2), через 24 часа после интратекального введения однократной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 3В представляет собой график, отображающий концентрацию киРНК в префронтальной коре головного мозга указанных приматов, отличных от человека (см. Фигуру 2), через 45 дней после интратекального введения однократной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 3С представляет собой график, отображающий концентрацию киРНК в стриатуме (хвостатое ядро) указанных приматов, отличных от человека (см. Фигуру 2), через 45 дней после интратекального введения однократной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 3D представляет собой график, отображающий концентрацию киРНК в стриатуме (путамен) указанных приматов, отличных от человека (см. Фигуру 2), через 45 дней после интратекального введения однократной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 3Е представляет собой график, отображающий концентрацию киРНК в грудном отделе позвоночника указанных приматов, отличных от человека (см. Фигуру 2), через 45 дней после интратекального введения однократной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 4А представляет собой график, отображающий корреляцию концентрации киРНК в тканях головного мозга и спинного мозга с уровнем нокдауна НТТ у приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг всех тестируемых дуплексов.

Фигура 4В представляет собой график, отображающий корреляцию концентрации кРНК в тканях головного мозга и спинного мозга с уровнем нокдауна НТТ у приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг дуплекса AD-1019465.

Фигура 4С представляет собой график, отображающий корреляцию концентрации кРНК в тканях головного мозга и спинного мозга с уровнем нокдауна НТТ у приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг дуплекса AD-1271082.

Фигура 4D представляет собой график, отображающий корреляцию концентрации кРНК в тканях головного мозга и спинного мозга с уровнем нокдауна НТТ у приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг дуплекса AD-1271085.

Фигура 5А представляет собой график, отображающий концентрацию кРНК в образцах плазмы крови с течением времени после однократной интратекальной дозы 60 мг дуплекса.

Фигура 5В представляет собой график, отображающий концентрацию кРНК в СМЖ и плазме крови в указанные моменты времени после однократного интратекального введения 60 мг всех тестируемых дуплексов (см. Фигуру 2).

Фигура 6А представляет собой график, отображающий уровень нокдауна мРНК мутантного человеческого НТТ во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг/кг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Для целей сравнения также показан эффект антисмыслового олигонуклеотида, томинерсена (Roche, также известного как IONIS-HTTRx и RG6042).

Фигура 6В представляет собой Вестерн-блот и график, отображающий уровень нокдауна мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг/кг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Уровни человеческого белка количественно определены на графике ниже. Для целей сравнения на графике также показан эффект антисмыслового олигонуклеотида, томинерсена (Roche, также известного как IONIS-HTTRx и RG6042).

На **Фигуре 7** схематически отображена часть транскрипта *Htt*, оцененного с помощью каждого анализа панели QuantiGene. Взято из Papadopolou, *et al.* (2019) *Scientific Reports* volume 9, Article number 16137.

Фигура 8А представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии *Htt* (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.), в спинном мозге и стриатуме КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ, и уровня экспрессии *Htt* (эндогенный мышинный), интрона 1 с полиА-сайтом 1

(вариант с 680 п. о.), в спинном мозге и стриатуме мышей дикого типа. Среднее значение $\pm$ СО, *** $p < 0,001$ (дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений) и #### $p < 0,001$ (непарный t-критерий с Si-контролем против ДТ). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 8В представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 2 (вариант с 1145 п. о.), в спинном мозге и стриатуме КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 μ г указанных агентов или контрольной ИСМЖ, и уровня экспрессии Htt (эндогенный мышинный), интрона 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.), в спинном мозге и стриатуме мышей дикого типа. Среднее значение $\pm$ СО, * $p < 0,05$ (дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений) и ## $p < 0,01$; #### $p < 0,001$ (непарный t-критерий с Si-контролем против ДТ). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 8С представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии полноразмерного (общего) хантингтина в спинном мозге и стриатуме КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 μ г указанных агентов или контрольной ИСМЖ и уровня экспрессии полноразмерного (общего) хантингтина в спинном мозге и стриатуме мышей дикого типа. Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-6$ на группу. Попарные сравнения указаны далее: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ (дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений) и #### $p < 0,001$; ##### $p < 0,0001$ (непарный t-критерий с Si-контролем против ДТ). Сравнение между группой 1 и группой 6 служит в качестве контроля для модельного (генотипического) эффекта. Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 8Д представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 на его 3'-конце (в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области) в спинном мозге и стриатуме КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 μ г указанных агентов или контрольной ИСМЖ, и уровня экспрессии полноразмерного (общего) хантингтина в спинном мозге и стриатуме мышей дикого типа. Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 8Е представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 3 (в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области), в спинном мозге и стриатуме КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 μ г указанных агентов или контрольной ИСМЖ, и уровня экспрессии полноразмерного (общего) хантингтина в спинном мозге и стриатуме мышей дикого типа. Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 8F представляет собой график, отображающий концентрацию мутантного белка хантингтина в спинном мозге и стриатуме гетерозиготных КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов, ненацеленного контрольного агента или контрольной ИСМЖ. Концентрация мутантного белка хантингтина показана в виде фемтомоль мутантного белка хантингтина на миллиграмм общего белка.

Фигура 8G представляет собой график, отображающий концентрацию белка хантингтина дикого типа в спинном мозге и стриатуме гетерозиготных КИ-мышей Q175 после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов, ненацеленного контрольного агента или контрольной ИСМЖ. Концентрация белка хантингтина дикого типа показана в виде фемтомоль белка хантингтина дикого типа на миллиграмм общего белка.

На Фигуре 9 отображен процент белка НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, хвостатого ядра стриатума, поясничного отдела позвоночника и грудного отдела позвоночника приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг AD-1019465 (n=5), AD-1271082 (n=5) или AD-1271085 (n=5), на День 45 после введения дозы. Процент оставшегося белка НТТ представлен относительно уровня белка НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 10А представляет собой график, отображающий уровень нокдауна мРНК мутантного человеческого НТТ во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Для целей сравнения также показан эффект антисмыслового олигонуклеотида, A-1800326 (томинерсен; Roche, также известный как IONIS-HTTRx и RG6042).

Фигура 10В представляет собой график, отображающий уровень нокдауна мРНК мышинового НТТ дикого типа во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Для целей сравнения также показан эффект антисмыслового олигонуклеотида, A-1800326 (томинерсен; Roche, также известный как IONIS-HTTRx и RG6042).

Фигура 10С представляет собой Вестерн-блот, отображающий уровень нокдауна мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа во фронтальной коре мышей YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). «ИСМЖ» относится к искусственной СМЖ; «476-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1019476; и «476-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1019476. Для детектирования белка использовали MAB2166 (EMD Millipore).

Фигура 10D представляет собой Вестерн-блот, отображающий уровень нокдауна мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа во фронтальной коре

мышей YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). «ИСМЖ» относится к искусственной СМЖ; «079-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1443079; «079-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1443079; «080-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1443080; и «080-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1443080. Для детектирования белка использовали MAB2166 (EMD Millipore).

Фигура 10Е представляет собой Вестерн-блот и графики, отображающие уровень нокдауна мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Лизаты из Фигуры 10С повторно анализировали с использованием антитела D7F7 для подтверждения наблюдаемого нокдауна белка НТТ. Уровни мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа количественно определены на графиках ниже. «ИСМЖ» относится к искусственной СМЖ; «476-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1019476; и «476-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1019476.

Фигура 10F представляет собой Вестерн-блот и графики, отображающие уровень нокдауна мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 300 мкг или 600 мкг указанных дуплексов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Лизаты из Фигуры 10D повторно анализировали с использованием антитела D7F7 для подтверждения наблюдаемого нокдауна белка НТТ. Уровни мутантного человеческого белка НТТ и мышинового белка дикого типа количественно определены на графиках ниже. Количественное определение на обоих блотах (блоты на Фигуре 10Е и Фигуре 10F) показано рядом для сравнения. «ИСМЖ» относится к искусственной СМЖ; «079-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1443079; «079-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1443079; «080-600» относится к дозе 600 мкг/кг AD-1443080; и «080-300» относится к дозе 300 мкг/кг AD-1443080.

Фигура 11А представляет собой график, отображающий уровень мутантного человеческого белка НТТ во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 37,5 мкг, 75 мкг, 150 мкг или 300 мкг AD-1019476 или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Использовали два различных антитела: MAB2166 (EMD Millipore) и D7F7 (Cell Signaling), и результаты для обоих антител продемонстрировали сходный нокдаун белка НТТ.

Фигура 11В представляет собой график, отображающий уровень мышинового белка дикого типа во фронтальной коре YAC128, которым вводили однократную дозу 37,5 мкг, 75 мкг, 150 мкг или 300 мкг AD-1019476 или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Использовали два различных антитела: MAB2166 (EMD Millipore) и D7F7 (Cell Signaling), и результаты для обоих антител

продемонстрировали сходный нокдаун белка НТТ.

Фигура 12А представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.), в спинном мозге мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Статистическая достоверность: **** $p < 0,0001$, Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. по сравнению с Q175 ДТ Si-контроль 10 мес.; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча/дисперсионный анализ по Уэлчу, критерий Даннета Т3 для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12В представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 2 (вариант с 1145 п. о.), в спинном мозге мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Статистическая достоверность: ** $p < 0,01$, Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. по сравнению с Q175 ДТ Si-контроль 10 мес.; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес., Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1271085 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча)/обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12С представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 на его 3'-конце (в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области), в спинном мозге мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Статистическая достоверность: * $p < 0,05$, Q175 НЕТ AD-1019448 10 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. (обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12D представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 3 (в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области), в спинном мозге мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО,

n=3-10 на группу. Отсутствие статистической достоверности: $p>0,05$, (непарный t-критерий с поправкой Уэлча /обычный однофакторный дисперсионный анализ). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12Е представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии полноразмерного (общего) хантингина в спинном мозге мышцей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, n=3-10 на группу. Статистическая достоверность: $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$, Q175 ДТ Si-контроль 10 мес., Q175 НЕТ AD-1271085 10 мес., Q175 НЕТ AD-1498524 10 мес., Q175 НЕТ AD-1019448 10 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес.; $***p<0,001$, $****p<0,0001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес., Q175 НЕТ AD-1271085 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча)/обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12F представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.), в стриатуме мышцей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, n=3-10 на группу. Статистическая достоверность: $****p<0,0001$, Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. по сравнению с Q175 ДТ Si-контроль 10 мес.; $****p<0,0001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча/дисперсионный анализ по Уэлчу, критерий Даннета Т3 для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12G представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 с полиА-сайтом 2 (вариант с 1145 п. о.), в стриатуме мышцей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, n=3-10 на группу. Статистическая достоверность: $***p<0,001$, Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. по сравнению с Q175 ДТ Si-контроль 10 мес.; $*p<0,05$, $***p<0,001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча)/обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12H представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 1 на его 3'-конце

(в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области), в стриатуме мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Статистическая достоверность: $*p<0,05$, Q175 НЕТ AD-1271085 10 мес. и Q175 НЕТ AD-1019448 10 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес. (обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12I представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) экспрессии Htt (эндогенного мышинового), интрона 3 (в качестве отрицательного контроля для детектирования экспрессии сохраненной интронной области), в стриатуме мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Отсутствие статистической достоверности: $p>0,05$, (непарный t-критерий с поправкой Уэлча /обычный однофакторный дисперсионный анализ). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12J представляет собой график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) экспрессии полноразмерного (общего) хантингтина в стриатуме мышей Q175 ДТ и НЕТ через 10 месяцев и 12 месяцев после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Данные представлены в виде среднего значения с СО, $n=3-10$ на группу. Статистическая достоверность: $**p<0,01$, $***p<0,001$, Q175 ДТ Si-контроль 10 мес., Q175 НЕТ AD-1271085 10 мес., Q175 НЕТ AD-1498524 10 мес., Q175 НЕТ AD-1019448 10 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 10 мес.; $****p<0,0001$, Q175 ДТ Si-контроль 12 мес., Q175 НЕТ AD-1271085 12 мес. и Q175 НЕТ AD-1498524 12 мес. по сравнению с Q175 НЕТ Si-контроль 12 мес. (непарный t-критерий с поправкой Уэлча)/обычный однофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений). Нормировано к геометрическому среднему для 3 референсных генов.

Фигура 12K представляет собой график, отображающий концентрацию мутантного белка хантингтина (вверху) и концентрацию общего белка НТТ (внизу) в стриатуме мышей Q175 ДТ и НЕТ после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной СМЖ (Si-контроль). Концентрация мутантного и общего белка хантингтина показана в виде фемтомоль мутантного белка хантингтина на миллиграмм общего белка. Статистическая достоверность: Q175 Het Si-контроль в сравнении с обработками: Однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений при сравнении в соответствующей временной точке. $*p\leq 0,05$, $***p<0,001$, $**p<0,01$, $****p<0,0001$.

Фигура 12L представляет собой график, отображающий концентрацию мутантного белка хантингтина (вверху) и концентрацию общего белка НТТ (внизу) в спинном мозге

мышей Q175ДТ и НЕТ после однократной интрацеребровентрикулярной инъекции 300 мкг указанных агентов или контрольной ИСМЖ (Si-контроль). Концентрация мутантного и общего белка хантингтина показана в виде фемтомоль мутантного белка хантингтина на миллиграмм общего белка. Статистическая достоверность: Q175 Het Si-контроль в сравнении с обработками: Однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением критерия Даннета для множественных сравнений при сравнении в соответствующей временной точке. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Фигура 13А представляет собой график, отображающий процент транскрипта НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума, хвостатого ядра стриатума и поясничного отдела позвоночника (L1-L3 позвоночника) приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 3 мг или 10 мг AD-1271085 ($n=8$), на День 33 после введения дозы. Процент оставшегося транскрипта НТТ представлен относительно уровня транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 13В представляет собой график, отображающий процент транскрипта НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума и хвостатого ядра стриатума приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 3 мг или 10 мг AD-1271085 ($n=8$), на День 33 после введения дозы. Процент оставшегося транскрипта НТТ представлен относительно уровня транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 13С представляет собой график, отображающий процент белка НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума, хвостатого ядра стриатума и поясничного отдела позвоночника (L1-L3 позвоночника) приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 3 мг или 10 мг AD-1271085 ($n=8$), на День 33 после введения дозы. Процент оставшегося белка НТТ представлен относительно уровня белка НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 13Д представляет собой график, отображающий процент белка НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума и хвостатого ядра стриатума приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 3 мг или 10 мг AD-1271085 ($n=8$), на День 33 после введения дозы. Процент оставшегося белка НТТ представлен относительно уровня белка НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 13Е представляет собой график, отображающий корреляцию эффекта интратекального введения однократной дозы 3 мг или 10 мг AD-1271085 ($n=8$) на День 33 после введения дозы и процента транскрипта и белка НТТ, оставшихся в тканях

префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума, хвостатого ядра стриатума и поясничного отдела позвоночника (L1-L3 позвоночника) приматов, отличных от человека. Процент оставшегося белка и транскрипта НТТ представлен относительно уровня белка и транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 14А представляет собой график, отображающий процент белка НТТ, оставшегося в тканях хвостатого ядра стриатума, путамена стриатума, гиппокампа, префронтальной коры головного мозга и поясничного отдела позвоночника приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528 (n=5), на День 59 после введения дозы. Процент оставшегося белка НТТ представлен относительно уровня белка НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 14В представляет собой график, отображающий процент транскрипта НТТ, оставшегося в тканях хвостатого ядра стриатума, путамена стриатума, гиппокампа, префронтальной коры головного мозга и поясничного отдела позвоночника приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528 (n=5), на День 59 после введения дозы. Процент оставшегося транскрипта НТТ представлен относительно уровня транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 14С представляет собой график, отображающий процент транскрипта НТТ, оставшегося в тканях префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума и поясничного отдела позвоночника приматов, отличных от человека, которым интратекально вводили однократную дозу 60 мг AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528 (n=5), на День 59 после введения дозы. Процент оставшегося транскрипта НТТ представлен относительно уровня транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 14D представляет собой график, отображающий корреляцию эффекта интратекального введения однократной дозы 60 мг AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528 (n=5) и процента транскрипта и белка НТТ, оставшихся в тканях приматов, отличных от человека, на День 59 после введения дозы. Процент оставшегося белка и транскрипта НТТ представлен относительно уровня белка и транскрипта НТТ в соответствующих тканях приматов, отличных от человека, которым вводили искусственную СМЖ (ИСМЖ).

Фигура 15 представляет собой схемы структур указанных дуплексов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции для РНКи, с помощью которых осуществляют опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена хантингтина (НТТ). Ген НТТ может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек.

Применение указанных иРНК (интерферирующих РНК) обеспечивает нацеленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена НТТ) у млекопитающих.

иРНК согласно настоящему изобретению сконструированы для нацеливания на полноразмерный ген НТТ, включая части гена, которые являются консервативными в ортологах НТТ других видов млекопитающих, например, осуществляя тем самым нацеливание на полноразмерный транскрипт дикого типа и полноразмерный мутантный транскрипт. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или подкомбинация указанных выше свойств и конкретных целевых сайтов или конкретные модификации в указанных иРНК обеспечивают иРНК согласно настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, долговечность и безопасность.

Соответственно, согласно настоящему изобретению также предложены способы применения композиций для РНКи согласно настоящему изобретению, включая композиции, содержащие один или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена НТТ или для лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором будет получена польза от ингибирования или снижения экспрессии гена НТТ, например, связанное с НТТ заболевание, например, болезнь Хантингтона (HD).

Агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, длина которой составляет примерно 30 нуклеотидов или меньше, например, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта мРНК гена НТТ. Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, длина которой составляет примерно 21-23 нуклеотида, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта мРНК гена НТТ.

Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), которая может иметь большую длину, например, до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов в длину с областью из по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов, которая по существу комплементарна по меньшей мере части транскрипта мРНК гена НТТ. Указанные агенты РНКи с более длинными антисмысловыми цепями предпочтительно включают вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, причем указанная смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение указанных агентов РНКи обеспечивает нацеленную деградацию мРНК гена НТТ у млекопитающих. Таким образом, способы и композиции, включающие

указанные агенты РНКи, можно применять для лечения субъекта, который получит пользу от снижения уровней или активности белка НТТ, такого как субъект, имеющий связанное с НТТ заболевание, такое как болезнь Хантингтона (HD).

В следующем подробном описании раскрыты способы получения и применения композиций, содержащих агенты РНКи, для ингибирования экспрессии гена НТТ, а также композиции и способы для лечения субъектов, имеющих заболевания и расстройства, которые могут получить пользу в результате ингибирования или снижения экспрессии генов.

I. Определения

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, сначала приведены определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что при указании значения или диапазона значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Артикли (соотв., «a» и «an» в исходном тексте на английском языке) используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (*то есть*, по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин «включая» используется в настоящем документе для обозначения выражения «включая без ограничения» и используется взаимозаменяемо с ним. Термин «или» используется в настоящем документе для обозначения термина «и/или» и используется взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает на иное.

Термин «примерно» используется в настоящем документе для обозначения нахождения в пределах типичных диапазонов допусков в данной области техники. Например, «примерно» можно понимать как примерно 2 стандартных отклонения от среднего значения. Согласно определенным вариантам реализации примерно означает $\pm 10\%$. Согласно определенным вариантам реализации примерно означает $\pm 5\%$. Когда «примерно» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «примерно» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Под термином «по меньшей мере», «не менее чем» или «или более» перед числом или рядом чисел понимается включение числа, смежного с термином «по меньшей мере», и всех последующих чисел или целых чисел, которые могут быть логически включены, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотид имеет указанное свойство. Если «по меньшей мере» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «по меньшей мере» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В настоящем документе «не более чем» или «менее чем» понимается как значение, относящееся к выражению и логическим более низким значениям или целым числам, как

логически следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с липким концом из «не более чем 2 нуклеотидов» имеет липкий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Если «не более чем» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «не более чем» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В настоящем документе способы детектирования могут включать определение того, что количество присутствующего аналита находится ниже уровня детектирования способа.

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

В случае противоречия между химической структурой и химическим названием, химическая структура имеет приоритет.

Термин «HTT» или «хантингтин», также известный как «Хантингтин», «белок болезни Хантингтона» «IT15», «HD», «белок HD» или «LOMARS», относится к хорошо известному гену, который кодирует белок, HTT, который широко экспрессируется, требуется для нормального развития, и патологическому гену, связанному с болезнью Хантингтона, нейродегенеративным расстройством, характеризующимся потерей нейронов стриатума, вызванной распространившимся нестабильным тринуклеотидным (CAG) повтором в гене хантингтина, который транслируется как полиглутаминовый повтор в белковом продукте.

Примерные нуклеотидные и аминокислотные последовательности HTT можно найти, например, под номером доступа в GenBank NM_002111.8 (*Homo sapiens* HTT, SEQ ID NO: 1, обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 6); под номером доступа в GenBank NM_010414.3 (*Mus musculus* HTT, SEQ ID NO: 2; обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 7); под номером доступа в GenBank: NM_024357.3 (*Rattus norvegicus* HTT, SEQ ID NO: 3, обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 8); под номером доступа в GenBank: XM_015449989.1 (*Macaca fascicularis* HTT, SEQ ID NO: 4, обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 9); и под номером доступа в GenBank: XM_028848247.1 (*Macaca mulatta* HTT, SEQ ID NO: 5, обратнoкомплементарная последовательность, SEQ ID NO: 10).

Дополнительные примеры последовательностей HTT можно найти в общедоступных базах данных, например, GenBank, OMIM и UniProt.

Дополнительную информацию о HTT можно найти, например, на www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3064.

Полное содержание каждого из вышеуказанных номеров доступа в GenBank и номеров базы данных генов включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи данной заявки.

Термин HTT в контексте настоящего документа также относится к вариациям гена HTT, включая варианты, представленные в базе данных SNP. Были идентифицированы многочисленные вариации последовательности в гене HTT, и их можно найти, например, в NCBI dbSNP и UniProt (см., например,

www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?LinkName=gene_snp&from_uid=3064, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи настоящей заявки.

В настоящем документе «целевая последовательность» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена НТТ, включая мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного транскрипционного продукта. Согласно одному варианту реализации целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для РНКи-направленного расщепления в этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена НТТ, или вблизи нее.

Длина целевой последовательности составляет примерно 15-30 нуклеотидов. Например, целевая последовательность может иметь примерно 15-30 нуклеотидов 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину. Согласно определенным вариантам реализации целевая последовательность представляет собой 19-23 нуклеотида в длину, необязательно 21-23 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

В настоящем документе термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, описанной с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно, в контексте модифицированного или немодифицированного нуклеотида. Однако будет понятно, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или суррогатному заменяющему фрагменту (см., например, Таблицу 1). Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве его основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, охарактеризованных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида

могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, охарактеризованных в настоящем изобретении.

Термины «иРНК», «агент РНКи», «иРНК-агент», «агент РНК-интерференции», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит РНК, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе, и который опосредует нацеленное расщепление транскрипта РНК посредством пути РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). РНК-интерференция (РНКи) представляет собой процесс, который направляет специфичную в отношении последовательности деградацию мРНК. РНКи модулирует, например, ингибирует экспрессию НТТ в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную интерферирующую РНК, которая взаимодействует с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК НТТ, для направления расщепления целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется эндонуклеазой типа III, известной как Dicer, на двухцепочечные короткие интерферирующие РНК (киРНК), содержащие смысловую цепь и антисмысловую цепь (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе-III фермент, процессирует эти дцРНК на короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-липкими концами из двух пар оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем эти киРНК встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более геликаз разматывают дуплекс киРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, чтобы индуцировать сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (оцРНК) (антисмысловая цепь дуплекса киРНК), созданной в клетке, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена НТТ. Соответственно, термин «киРНК» также используется в настоящем документе для обозначения РНКи, как описано выше.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи может представлять собой одноцепочечную РНК, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные агенты РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные киРНК обычно представляют собой 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Дизайн и тестирование одноцепочечных РНК описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящий

документ посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может применяться в качестве одноцепочечной киРНК, описанной в настоящем документе, или как химически модифицированная с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

Согласно другому варианту реализации «агент РНКи» для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и в настоящем документе называется «двухцепочечным агентом РНКи», «двухцепочечной молекулой РНК (дцРНК)», «агентом на основе дцРНК» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, содержащую две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, называемые «смысловой» и «антисмысловой» ориентациями по отношению к целевой РНК, т. е. гену НТТ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) запускает деградацию целевой РНК, например, мРНК, посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга генов, называемого в настоящем документе РНК-интерференцией или РНКи.

В целом, молекула дцРНК может включать рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи также могут включать один или более нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид, модифицированный нуклеотид. Кроме того, в данном описании «агент РНКи» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; агент РНКи может включать значительные модификации в нескольких нуклеотидах. В настоящем документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в агентах согласно настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа киРНК, включены в термин «агент РНКи» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида, если он присутствует в агенте РНКи, можно считать представляющим собой модифицированный нуклеотид.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфичную деградацию желаемой целевой РНК посредством пути RISC, и может находиться в диапазоне примерно 15-36 пар оснований в длину, например, примерно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, примерно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21,

18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Согласно определенным вариантам реализации дуплексная область представляет собой 19-21 пару оснований в длину, например, 21 пару оснований в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные части одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Если две цепи являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющая цепь РНК называется «петлей шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может содержать по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов или нуклеотидов, не направленных на целевой сайт, дцРНК. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 10 или менее нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 8 или менее неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-10 неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-8 нуклеотидов.

Если две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно должны быть соединены, но могут быть ковалентно соединены. Согласно определенным вариантам реализации в том случае, если две цепи ковалентно соединены путем, отличным от непрерывной цепи нуклеотидов, между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют «линкером» (хотя следует отметить, что некоторые другие структуры, определенные в другом месте в настоящем документе, также можно назвать «линкером»). Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых липких концов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре РНКи может содержать один или более нуклеотидных липких концов. Согласно одному варианту реализации агента РНКи по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно определенным

вариантам реализации по меньшей мере одна цепь содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации как 3'-конец, так и 5'-конец одной цепи агента РНКи содержат липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой независимо содержит 19-23 нуклеотида, которые взаимодействуют с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК НТТ, для направления расщепления целевой РНК.

В настоящем документе термин «нуклеотидный липкий конец» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры агента РНКи, например, дцРНК. Например, если 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, существует нуклеотидный липкий конец. дцРНК может содержать липкий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; в качестве альтернативы, липкий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

Согласно определенным вариантам реализации антисмысловая цепь дцРНК содержит 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

Согласно определенным вариантам реализации липкий конец на смысловой цепи или антисмысловой цепи может иметь большую длину, превышающую 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов в длину. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно

определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом. Согласно определенным вариантам реализации липкий конец включает самокомплементарную часть таким образом, что липкий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

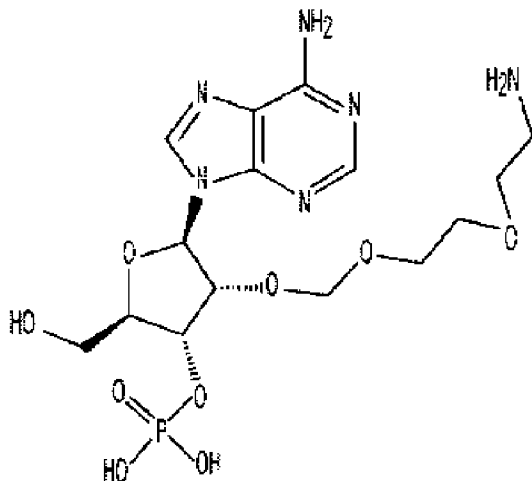
Согласно определенным вариантам реализации по меньшей мере один конец по меньшей мере одной цепи простирается за пределы дуплексной нацеливающей области, включая структуры, в которых одна из цепей включает термодинамически стабилизирующую четырехпетлевую структуру (см., например, патенты США №№ 8513207 и 8927705, а также W02010033225, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Такие структуры могут включать одноцепочечные удлинения (с одной или с обеих сторон молекулы), а также двухцепочечные удлинения.

Согласно определенным вариантам реализации 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи соединены полинуклеотидной последовательностью, содержащей рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или и то, и другое, причем необязательно указанная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность четырехчастной петли. Согласно определенным вариантам реализации смысловая цепь представляет собой 25-35 нуклеотидов в длину.

Четырехчастная петля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Как правило, четырехчастная петля имеет от 4 до 5 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля содержит последовательность, представленную как GAAA. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из нуклеотидов петли (GAAA) содержит нуклеотидную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 2'-модификация представляет собой модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-аминоэтил, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-аминодиэтоксиметанол, 2'-адем и 2'-дезоксид-2'-фтор-d-арабинонуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации все нуклеотиды петли модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации G в последовательности GAAA содержит 2'-ОН. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из нуклеотидов в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из A в последовательности GAAA содержит 2'-ОН, и G в последовательности GAAA содержит 2'-

О-метильную модификацию. Согласно предпочтительным вариантам реализации, согласно некоторым вариантам реализации, каждый из А в последовательности GAAA содержит 2'-О-метоксиэтильную модификацию (МОЕ), и G в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию; или каждый из А в последовательности GAAA содержит модификацию 2'-адем, и G в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию. См., например, РСТ публикацию WO 2020/206350, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примерный 2'-адем-модифицированный нуклеотид показан ниже:



Термины «тупой» или «с тупыми концами», используемые в настоящем документе в отношении дцРНК, означают отсутствие неспаренных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов на указанном конце дцРНК, т. е. отсутствие нуклеотидного липкого конца. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Если оба конца дцРНК являются тупыми, то считается, что дцРНК имеет тупые концы. Для ясности, дцРНК с «тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая является тупой на обоих концах, т. е. не имеет нуклеотидного липкого конца на любом конце молекулы. Чаще всего такая молекула будет иметь двухцепочечную структуру по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи агента РНКи, например, дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна целевой последовательности, например, мРНК НТТ.

В настоящем документе термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности НТТ, определенной в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. Обычно наиболее переносимые несовпадения находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'-конца или 3'-конца агента РНКи. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в антисмысловой цепи. Согласно некоторым

вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с целевой мРНК, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с целевой мРНК. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений со смысловой цепью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений со смысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с антисмысловой цепью, например, смысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с антисмысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. Согласно другому варианту реализации несовпадение нуклеотидов находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде агента РНКи. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение(я) не присутствует(ют) в затравочной области.

Таким образом, агент РНКи, описанный в настоящем документе, может содержать одно или более несовпадений с целевой последовательностью. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 3 несовпадений (т. е. 3, 2, 1 или 0 несовпадений). Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 2 несовпадений. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 1 несовпадения. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит 0 несовпадений. Согласно определенным вариантам реализации, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит несовпадения с целевой последовательностью, несовпадение необязательно может быть ограничено нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов либо 5'-конца, либо 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах реализации для 23-нуклеотидного агента РНКи цепь, которая комплементарна области гена НТТ, обычно не содержит какого-либо несовпадения в пределах 13 центральных нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения того, является ли агент РНКи, содержащий несовпадение с целевой последовательностью, эффективным в ингибировании экспрессии гена НТТ. Рассмотрение эффективности агентов РНКи с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена НТТ является важным, в частности, если известно, что конкретная область комплементарности в гене НТТ имеет полиморфную вариацию последовательности в популяции.

Термин «смысловая цепь» или «пассажирская цепь» в контексте настоящего документа относится к цепи агента РНКи, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе.

В настоящем документе термин «область расщепления» относится к области, которая расположена непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт на мишени, в котором происходит расщепление. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит два основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации сайт расщепления конкретно находится в сайте, связанном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

В настоящем документе, и если не указано иное, термин «комплементарный» при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники.

Комплементарные последовательности в пределах агента РНКи, например, в пределах дцРНК, описанной в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В настоящем документе такие последовательности могут называться «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако, если в настоящем документе первая последовательность называется «по существу комплементарной» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований после гибридизации для дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена посредством пути RISC. Однако если два олигонуклеотида сконструированы, чтобы образовывать при гибридизации один или более одноцепочечных липких концов, такие липкие концы не должны рассматриваться как несовпадения в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, в которой более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все еще может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных в настоящем документе.

«Комплементарные» последовательности в контексте настоящего документа также могут включать или могут быть полностью образованы из пар оснований, отличных от пар по Уотсону-Крику, или пар оснований, образованных из неприродных и

модифицированных нуклеотидов, в той степени, в которой выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные от пар по Уотсону-Крику, включают, но не ограничиваются этим, неоднозначное спаривание оснований G:U или спаривание по Хугстину.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем документе можно применять в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между антисмысловой цепью агента РНКи и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

В настоящем документе полинуклеотид, который «по существу комплементарен по меньшей мере части» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей НТТ). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК НТТ, если последовательность является по существу комплементарной непрерывной части мРНК, кодирующей НТТ.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, являются полностью комплементарными целевой последовательности НТТ. Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевому комплементарному компоненту последовательности НТТ и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1-5, или фрагменту любой из SEQ ID NO:1-5, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности НТТ и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, аналогичен целевой последовательности НТТ, и причем указанный полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно

80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 6-10, или фрагменту любой из SEQ ID NO: 6-10, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности НТТ, и причем указанный полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2-5, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена НТТ оценивают по снижению количества мРНК НТТ, которая может быть выделена из первой клетки или группы клеток или детектирована в ней, в которой ген НТТ транскрибирован и которая подвергалась обработке таким образом, что экспрессия гена НТТ ингибируется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но которая не подвергалась такой обработке (контрольные клетки). Степень ингибирования может быть выражена следующим образом:

$$((\text{мРНК в контрольных клетках}) - (\text{мРНК в обработанных клетках})) / (\text{мРНК в контрольных клетках}) * 100\%$$

Выражение «приведение клетки в контакт с агентом РНКи», таким как дцРНК, в контексте настоящего документа включает приведение клетки в контакт с помощью любых возможных средств. Приведение клетки в контакт с агентом РНКи включает приведение клетки в контакт *in vitro* с агентом РНКи или приведение клетки в контакт *in vivo* с агентом РНКи. Приведение в контакт может быть выполнено непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, агент РНКи можно привести в физический контакт с клеткой с помощью индивидуума, выполняющего способ, или, в качестве альтернативы, агент РНКи можно поместить в ситуацию, которая позволит или заставит его впоследствии вступить в контакт с клеткой.

Контакт с клеткой *in vitro* можно осуществлять, например, путем инкубации клетки с агентом РНКи. Контакт с клеткой *in vivo* можно осуществлять, например, путем инъекции агента РНКи в ткань или вблизи нее, где расположена клетка, или путем инъекции агента РНКи в другую область, например, центральную нервную систему (ЦНС), необязательно посредством интратекальной, интравитреальной или другой инъекции, или путем инъекции в кровотоки или подкожное пространство, таким образом, что агент впоследствии достигнет

ткани, где находится клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, агент РНКи может содержать лиганд или может быть соединен с ним, например, липофильный фрагмент или фрагменты, описанные ниже и более подробно, например, в РСТ/US2019/031170, который включен в настоящий документ посредством ссылки, который направляет или иным образом стабилизирует агент РНКи в представляющем интерес сайте, например, в ЦНС. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт *in vitro* с агентом РНКи и впоследствии трансплантировать субъекту.

Согласно одному варианту реализации приведение клетки в контакт с агентом РНКи включает «введение» или «доставку агента РНКи в клетку» путем облегчения или осуществления поглощения или всасывания в клетку. Всасывание или поглощение агента РНКи может происходить посредством пассивных диффузионных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение агента РНКи в клетку можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* агент РНКи можно вводить путем инъекции в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе ниже или известны в данной области техники.

Термин «липофил» или «липофильный фрагмент» в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, обладающему аффинностью в отношении липидов. Одним из путей характеристики липофильности липофильного фрагмента является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой отношение концентрации химического вещества в фазе октанола к его концентрации в водной фазе двухфазной системы при равновесии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой измеренное в лаборатории свойство вещества. Однако его также можно прогнозировать с использованием коэффициентов, относимых к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитывают с использованием основных принципов или эмпирических способов (см., например, Tetko et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21 (2001), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Он обеспечивает термодинамический показатель тенденции вещества к предпочтению неводной или масляной среды, а не воды (т. е. его гидрофильно-липофильный баланс). В принципе, химическое вещество является липофильным по характеру, если его $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильный фрагмент имеет $\log K_{ow}$, превышающий 1, превышающий 1,5, превышающий 2, превышающий 3, превышающий 4, превышающий 5 или превышающий 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ 6-аминогексанола, например, будет составлять приблизительно 0,7. С применением этого же способа прогнозируется, что $\log K_{ow}$ холестерил-N-(гексан-6-ол)-карбамата составляет 10,7.

Липофильность молекулы может изменяться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или

аминогруппы к концу липофильного фрагмента может увеличивать или уменьшать значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильного фрагмента.

В качестве альтернативы, гидрофобность двухцепочечного агента РНКи, конъюгированного с одним или более липофильными фрагментами, может быть измерена на основании его характеристик связывания с белками. Например, в определенных вариантах реализации несвязанную фракцию двухцепочечного агента РНКи в анализе связывания с белками плазмы крови можно определить как положительно коррелирующую с относительной гидрофобностью двухцепочечного агента РНКи, которая затем может положительно коррелировать с активностью сайленсинга двухцепочечного агента РНКи.

Согласно одному варианту реализации установленный анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Примерный протокол этого анализа связывания подробно проиллюстрирован, например, в РСТ/US2019/031170. Гидрофобность двухцепочечного агента РНКи, измеренная по фракции несвязанной киРНК в анализе связывания, превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 для улучшенной доставки киРНК *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним положением(положениями) двухцепочечного агента РНКи обеспечивает оптимальную гидрофобность для улучшенной доставки киРНК *in vivo*.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, агент гNAi или плазмиду, из которой транскрибируется агент РНКи. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящем документе «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), или отличное от примата животное (такое как крыса или мышь). Согласно предпочтительному варианту реализации субъект представляет собой человека, такого как человек, которого лечат или оценивают на наличие заболевания, расстройства или состояния, при котором будет получена польза от снижения экспрессии НТТ; человека, подверженного риску развития заболевания, расстройства или состояния, при котором будет получена польза от снижения экспрессии НТТ; человека, имеющего заболевание, расстройство или состояние, при котором будет получена польза от снижения экспрессии НТТ; или человека, у которого лечат заболевание, расстройство или состояние, при котором будет получена польза от снижения экспрессии НТТ, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой женщину. Согласно другим вариантам реализации субъект представляет собой мужчину. Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой взрослого субъекта.

Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой педиатрического субъекта. Согласно другому варианту реализации субъект представляет собой ювенильного субъекта, т. е. субъекта в возрасте менее 20 лет.

В настоящем документе термины «осуществлять лечение» или «лечение» относятся к благоприятному или желаемому результату, включая, но не ограничиваясь этим, *облегчение* или уменьшение одного или более признаков или симптомов, связанных с экспрессией гена НТТ или продукцией белка НТТ, например, связанных с НТТ заболеваний, таких как болезнь Хантингтона. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня НТТ у субъекта или маркера заболевания, или симптома относится к статистически достоверному уменьшению такого уровня. Уменьшение может представлять собой, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение составляет по меньшей мере 20%. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение составляет по меньшей мере 50% уменьшение маркера заболевания, например, уровня экспрессии белка или гена. «Более низкий» в контексте уровня НТТ у субъекта предпочтительно находится ниже уровня, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума без такого расстройства. Согласно определенным вариантам реализации «более низкий» представляет собой уменьшение различия между уровнем маркера или симптома у субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума, например, уровень уменьшения веса тела между индивидуумом с ожирением и индивидуумом, имеющим вес, принятый как находящийся в пределах нормального диапазона.

В настоящем документе «предотвращение» или «предотвращать» при использовании в отношении заболевания, расстройства или состояния, при которых будет получена польза от снижения экспрессии гена НТТ или продукции белка НТТ, относится к снижению вероятности развития у субъекта симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием, например, симптома связанного с НТТ заболевания. Невозможность развития заболевания, расстройства или состояния или снижение вероятности развития симптома, связанного с таким заболеванием, расстройством или состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически приемлемой шкале для этого заболевания или расстройства), или появление отсроченных симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы) считается эффективным предотвращением.

В настоящем документе под термином «связанное с НТТ заболевание» или «связанное с НТТ расстройство» понимают любое заболевание или расстройство, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии и/или активности НТТ. Примерные заболевания, связанные с НТТ, включают болезнь Хантингтона.

«Болезнь Хантингтона», также известная как HD, хорея Хантингтона, большая хорея, хроническая прогрессирующая хорея и наследственная хорея, представляет собой

аутосомно-доминантное генетическое расстройство, характеризующееся хореоподобными движениями и прогрессирующим интеллектуальным ухудшением, обычно начинающимися в среднем возрасте (от 35 до 50 лет). Заболевание поражает оба пола в равной степени. Атрофируется хвостатое ядро, вырождается популяция мелких клеток и уменьшаются уровни нейротрансмиттеров гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и вещества Р. Эта дегенерация приводит к характерным «угловатым желудочкам», наблюдаемым при КТ-сканировании.

Симптомы и признаки HD развиваются незаметно. Наиболее очевидными симптомами HD являются патологические движения тела, называемые хореей, и отсутствие координации, но она также влияет на ряд умственных способностей и некоторые аспекты личности. Эти физические симптомы обычно становятся заметными к сорокалетнему возрасту индивидуума, но могут возникать в любом возрасте. Если возраст начала заболевания составляет менее 20 лет, это известно как ювенильная HD.

Деменция или психические нарушения, варьирующиеся от апатии и раздражительности до полномасштабного биполярного или шизофренического расстройства, могут предшествовать двигательному расстройству или могут развиваться в ходе его развития. Ангедония или асоциальное поведение могут быть первым поведенческим проявлением. Двигательные проявления включают дерганные движения конечностей, ритмичную походку, непостоянство двигательной активности (неспособность поддерживать двигательный акт, такой как высовывание языка), гримасничанье, атаксию и дистонию.

HD вызывается распространением тринуклеотидного повтора в гене хантингтина (НТТ) и является одним из нескольких заболеваний, связанных с распространением полиглутамина (или распространением полиQ). Это приводит к образованию удлиненной формы мутантного белка хантингтина (mHtt), которая вызывает гибель клеток в селективных участках головного мозга.

«Терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему связанное с НТТ заболевание, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, уменьшения или сохранения существующего заболевания или одного или более симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему связанное с НТТ расстройство, является достаточным для предотвращения или уменьшения заболевания или одного или более симптомов заболевания. Уменьшение

заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания с более поздним началом. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, степени риска развития заболевания и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество агента РНКи, которое обеспечивает некоторый желаемый локальный или системный эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Агент РНКи, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для получения разумного соотношения польза/риск, применимого к такому лечению.

Выражение «фармацевтически приемлемый» применяется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов (включая соли), композиций или лекарственных форм, которые, в рамках обоснованного медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

Выражение «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, производственное вспомогательное вещество (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не должен быть вредным для субъекта, которого лечат. 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 карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие агенты, такие как, стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) вспомогательные вещества, 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 агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) воду, не содержащую пирогенов; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буферные растворы; (21) полиэфиры,

поликарбонаты или полиангидриды; (22) объемообразующие агенты, такие как полипептиды и аминокислоты, (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Термин «образец» в контексте настоящего документа включает набор сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Согласно определенным вариантам реализации образцы могут быть получены из головного мозга (например, всего головного мозга или определенных сегментов головного мозга, например, стриатума или определенных типов клеток в головном мозге, таких как, например, нейроны и глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, микроглиальные клетки)). Согласно некоторым вариантам реализации «образец, полученный от субъекта» относится к крови, взятой у субъекта, или плазме или сыворотке крови, полученной из нее. Согласно дополнительным вариантам реализации «образец, полученный от субъекта» относится к ткани головного мозга (или ее подкомпонентам) или ткани сетчатки (или ее подкомпонентам), полученной от субъекта.

II. Агенты РНКи согласно настоящему изобретению

В настоящем документе описаны агенты РНКи, которые ингибируют экспрессию гена НТТ. Согласно одному варианту реализации агент РНКи включает двухцепочечные молекулы рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена НТТ в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, имеющий связанное с НТТ заболевание, например болезнь Хантингтона. дцРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена НТТ. Область комплементарности представляет собой примерно 15-30 нуклеотидов или меньше в длину. При контакте с клеткой, экспрессирующей ген НТТ, агент РНКи ингибирует экспрессию гена НТТ (например, гена человека, гена примата, гена животного, отличного от примата) по меньшей мере на 50% по данным анализа с помощью, например, ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bdNA) или способа на основе белка, например, иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В одном из них уровень нокдауна анализируют в клетках Cos7 с использованием способа анализа двух люцифераз.

дцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет применяться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и обычно полностью комплементарна целевой

последовательности. Целевая последовательность может быть получена из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена НТТ. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи так, что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в качестве самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от нахождения на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно дуплексная структура представляет собой от 15 до 30 пар оснований в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации дуплексная структура представляет собой от 18 до 25 пар оснований в длину, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований в длину, например, 19-21 пару оснований в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности представляет собой от 15 до 30 нуклеотидов в длину, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, например, 19-23 нуклеотида в длину или 21-23 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации дуплексная структура представляет собой от 19 до 30 пар оснований в длину. Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности представляет собой от 19 до 30 нуклеотидов в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК представляет собой от 15 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов в длину или от 25 до 30 нуклеотидов в длину. Обычно дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, из уровня техники хорошо известно, что дцРНК длиннее примерно 21-23 нуклеотидов могут служить в качестве субстратов Dicer. Обычный специалист в данной области техники также поймет, что область РНК, которая является мишенью для расщепления, чаще всего будет являться частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» целевой мРНК

представляет собой непрерывную последовательность целевой мРНК, имеющую достаточную длину, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути RISC).

Специалист в данной области техники также поймет, что дуплексная область представляет собой первичную функциональную часть дцРНК, например, дуплексную область из примерно 15-36 пар оснований, например, 15-36, 15-35, 15-34, 15-33, 15-32, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, или 21-22 пар оснований, например, 19-21 пары оснований. Таким образом, согласно одному варианту реализации, в той степени, в которой она(он) подвергается процессингу в функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, обычный специалист в данной области техники поймет, что согласно одному варианту реализации миРНК представляет собой дцРНК. Согласно другому варианту реализации дцРНК не представляет собой встречающуюся в природе миРНК. Согласно другому варианту реализации агент РНКи, который можно применять для нацеливания на экспрессию НТТ, не образуется в целевой клетке путем расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная в настоящем документе, может дополнительно включать один или более одноцепочечных нуклеотидных липких концов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

дцРНК может быть синтезирована с помощью стандартных способов, известных в данной области техники. Двухцепочечные соединения РНКи согласно настоящему изобретению можно получить с использованием двухэтапной процедуры. Сначала отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают по отдельности. Затем цепь-компоненты ренатурируют. Отдельные цепи соединения киРНК могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого. Преимуществом органического синтеза является легкое получение олигонуклеотидных цепей, содержащих неприродные или модифицированные нуклеотиды. Сходным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого.

Согласно одному аспекту дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и

антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи для НТТ может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2-5, и соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи для смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей в любой из Таблиц 2-5. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, созданной при экспрессии гена НТТ. Таким образом, в данном аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, причем один олигонуклеотид описан в качестве смысловой цепи (пассажирской цепи) в любой из Таблиц 2-5, и второй олигонуклеотид описан в качестве соответствующей антисмысловой цепи (направляющей цепи) смысловой цепи в любой из Таблиц 2-5.

Согласно одному варианту реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. Согласно другому варианту реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что, хотя некоторые из последовательностей в Таблицах 2-5 описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК согласно настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в любой из Таблиц 2-5, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной отличным образом от последовательностей, описанных в таблицах. Например, несмотря на то, что смысловые цепи агентов согласно настоящему изобретению, показанные в Таблице 3, конъюгированы с лигандом C16, эти агенты могут быть конъюгированы с фрагментом, который направляет доставку в печень, например, лигандом GalNAc, описанным в настоящем документе. Липофильный лиганд может быть включен в любое из положений, предложенных в настоящей заявке.

Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру из примерно 20-23 пар оснований, например, 21 пару оснований, были хорошо приняты как особенно эффективные в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, (2001) *EMBO J.*, 20:6877-6888). Однако другие обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вариантах реализации, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, предложенных в настоящем документе, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, за исключением только нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут обладать подобной эффективностью в сравнении с дцРНК, описанными выше. Следовательно, предусмотрено, что дцРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей

согласно настоящему изобретению и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена НТТ не более чем на 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования дцРНК, содержащей полную последовательность, по данным анализа *in vitro* в клетках Cos7 и 10 нМ концентрации РНК-агента и анализа методом ПЦР, как представлено в примерах в настоящем документе, включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, описанные в настоящем документе, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте НТТ, который(ые) является(являются) восприимчивым(и) к RISC-опосредуемому расщеплению. Таким образом, согласно настоящему изобретению дополнительно охарактеризованы агенты РНКи, которые нацелены в пределах этого сайта(сайтов). В настоящем документе считается, что агент РНКи нацелен в пределах конкретного сайта транскрипта РНК, если агент РНКи способствует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах данного конкретного сайта. Такой агент РНКи обычно будет включать по меньшей мере примерно 15 последовательных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов, из одной из последовательностей согласно настоящему изобретению, связанных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене НТТ.

III. Модифицированные агенты РНКи согласно настоящему изобретению

Согласно одному варианту реализации РНК агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, не модифицирована и не содержит, например, химических модификаций или конъюгаций, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам реализации РНК агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, химически модифицирована для повышения стабильности или других благоприятных характеристик. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по существу все нуклеотиды агента РНКи согласно настоящему изобретению модифицированы. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения все нуклеотиды агента РНКи согласно настоящему изобретению модифицированы. Агенты РНКи согласно настоящему изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды модифицированы» в значительной степени, но не полностью, модифицированы и могут включать не более 5, 4, 3, 2 немодифицированных нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 модифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно синтезировать или модифицировать с помощью способов, хорошо установленных в данной области техники, таких как описанные в источнике «Current protocols in nucleic acid chemistry,» Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают: например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или 3'-концевые модификации (конъюгирование,

ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи, и т. д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями, или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды), или конъюгированные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры агентов РНКи, которые можно применять в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются этим, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, помимо прочего, РНК, не содержащие атома фосфора в остова. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидном остова, также можно считать олигонуклеозидами. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный агент РНКи будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остова.

Модифицированные остовы РНК включают: например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидаты и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги, и те, которые имеют инвертированную полярность, при которой смежные пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме свободной кислоты. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли. Согласно одному варианту реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия. Согласно определенным вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте. Агенты, в которых по существу все из фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных связей имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной и/или фосфотиоатной связи без противоиона натрия. Согласно некоторым вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше

фосфоросодержащих связей, включают: но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6 239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не включают в себя атом фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкены остовы, сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые основы; сульфонатные и сульфонамидные основы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другим вариантам реализации для применения в агентах РНКи предусмотрены подходящие миметики РНК, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Звенья оснований сохраняют для гибридизации с подходящим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает отличными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидосодержащим остовом, в частности, аминоксилотным остовом. Нуклеиновые основания сохранены и связаны, непосредственно или опосредованно, с атомами азота амидной части остова. Типичные патенты США, в которых раскрыто получение соединений PNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в агентах для РНКи согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты реализации, охарактеризованные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и, в частности, $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метиленовый (метиимино) остов или остов ММ], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как $--O--P--O--CH_2--$] из упомянутого выше патента США № 5489677, и амидные остовы из упомянутого выше патента США № 5602240. Согласно некоторым вариантам реализации РНК, охарактеризованные в настоящем документе, имеют структуры морфолинового остова из вышеупомянутого US 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. Агенты РНКи, например дцРНК, охарактеризованные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и алкинил. Примерные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m находятся в диапазоне от 1 до примерно 10. Согласно другим вариантам реализации дцРНК включают одно из следующих в 2'-положении: C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкламино, замещенный силил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств агента РНКи, или группу для улучшения фармакодинамических свойств агента РНКи, и другие заместители, имеющие подобные свойства. Согласно некоторым вариантам реализации модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. группу алкокси-алкокси. Другая примерная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известную как 2'-DMAOE, описанную в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламинооксиэтокси (также известную в данной области техники как 2'-O-диметиламинооксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е., 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Дополнительные примерные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-изомеры, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃, 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-O-гексадецил и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также можно вносить в других положениях на РНК агента РНКи, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Агенты РНКи также могут содержать миметики сахара, такие как фрагменты циклобутила, вместо пентофуранозильного сахара. Типичные патенты США, в которых

раскрыто получение таких модифицированных структур сахара, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920, некоторые из которых находятся в общем владении с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из упомянутых выше документов включено в настоящий документ посредством ссылки.

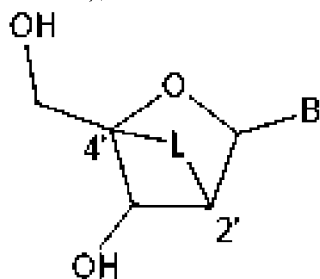
Агент РНКи согласно настоящему изобретению также может включать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто как «основание»). В настоящем документе «немодифицированные» или «природные» нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые Englisch *et al.*, (1991) *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613, и раскрытые Sanghvi, Y S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, охарактеризованных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замены увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и представляют собой примерные замены оснований, еще более конкретно при комбинировании с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахара.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются перечисленными, упомянутые выше патенты США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272;

5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более бициклических сахарных фрагментов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное кольцом, образованным путем образования мостика между двумя углеродами, будь то смежными или не смежными. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент, содержащий кольцо, образованное путем образования мостика между двумя углеродами, будь то смежными или не смежными, сахарного кольца с образованием тем самым бициклической кольцевой системы. Согласно определенным вариантам реализации мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца, необязательно посредством 2'-ациклического атома кислорода. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации агент согласно настоящему изобретению может включать одну или более блокированных нуклеиновых кислот (LNA). Блокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «блокирует» рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление блокированных нуклеиновых кислот к кРНК повышает стабильность кРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. Согласно определенным вариантам реализации антисмысловые полинуклеотидные агенты согласно настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'.

Блокированный нуклеозид может быть представлен структурой (не учитывая стереохимию),



где В представляет собой нуклеиновое основание или модифицированное

нуклеиновое основание, и L представляет собой связывающую группу, которая соединяет 2'-углерод с 4'-углеродом рибозного кольца. Примеры таких 4'-2'-мостиковых бициклических нуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также называемый «ограниченным этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см. например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12-алкил, или защитную группу для атома азота (см. например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из упомянутых выше документов включено в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные типичные патенты США и публикации патентов США, в которых раскрыто получение блокированных нуклеотидов нуклеиновой кислоты, включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие: патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Может быть получен любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов, имеющий одну или более стереохимических конфигураций сахара, включая, например, альфа-L-рибофуранозу и бета-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК в случае иРНК также может быть модифицирована для включения одного или более ограниченных этилнуклеотидов. В настоящем документе термин «ограниченный этилнуклеотид» или «сEt» представляет собой блокированную нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2' (т. е. L в предыдущей структуре). Согласно одному варианту реализации ограниченный этилнуклеотид находится в S-конформации, называемой в настоящем документе «S-сEt».

иРНК согласно настоящему изобретению также может включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4'-углероды рибозы или C3 и -C5'-углероды рибозы. CRN блокируют рибозное кольцо в стабильной конформации и повышают аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для размещения кислорода в оптимальном положении для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему «сморщиванию» рибозного кольца.

Типичные публикации, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше CRN, включают, но не ограничиваются перечисленными, публикацию патента США № 2013/0190383 и РСТ публикацию WO 2013/036868, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (неблокированные нуклеиновые кислоты). UNA представляет собой неблокированную ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием неблокированного «сахарного» остатка. В одном примере UNA также включает мономер, в котором удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1'- и C4'-углеродами). В другом примере связь C2'-C3' сахара (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между C2'- и C3'-углеродами) была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и *Fluiter et al., Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, которые включены в настоящий документ посредством ссылки).

Типичные публикации США, в которых раскрыто получение UNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, патент США № 8314227 и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3'-фосфат, инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид, такой как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA), инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

В одном примере 3'- или 5'-конец олигонуклеотида связан с инвертированным 2'-дезоксидифицированным рибонуклеотидом, таким как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA) или инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb). В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи, описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодиэфирной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным лишенным азотистого основания рибонуклеотидом (iAb). В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным dA (idA).

В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи, описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодиэфирной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи представляют собой инвертированный dA (idA) и связаны с предыдущим нуклеотидом посредством 3'-3'-связи (например, 3'-3'-фосфотиоатной связи).

Другие модификации нуклеотидов иРНК согласно настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой цепи иРНК. Подходящие миметики фосфата раскрыты, например, в публикации патента США № 2012/0157511, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

А. Модифицированные агенты РНКи, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают агенты с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO 2013/075035, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Как показано в настоящем документе и в WO 2013/075035, превосходный результат можно получить путем введения одного или более мотивов трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь или антисмысловую цепь агента РНКи, в частности, в сайте расщепления или вблизи него. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь и антисмысловая цепь агента РНКи в ином случае могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает профиль модификации смысловой или антисмысловой цепи, если он присутствует. Агент РНКи может быть необязательно конъюгирован с липофильным лигандом, например, с C16-лигандом, например, на смысловой цепи. Агент РНКи может быть необязательно модифицирован с использованием модификации (S)-гликольнуклеиновой кислотой (GNA), например, на одном или более остатках антисмысловой цепи. Полученные в результате агенты РНКи характеризуются превосходной активностью сайленсинга генов.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены двухцепочечные агенты РНКи, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена НТТ) *in vivo*. Агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь агента РНКи может иметь 15-30 нуклеотидов в длину. Например, каждая цепь может иметь 16-30 нуклеотидов в длину, 17-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 17-23 нуклеотида в длину, 17-21 нуклеотид в длину, 17-19 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотида в длину, 19-21 нуклеотид в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотида в длину. Согласно определенным вариантам реализации каждая цепь представляет собой 19-23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую в настоящем документе «агент РНКи». Дуплексная область агента РНКи может иметь 15-30 нуклеотидных пар в длину. Например, дуплексная область может иметь 16-30 нуклеотидных пар в длину, 17-30 нуклеотидных пар в длину, 27-30 нуклеотидных пар в длину, 17-23 нуклеотидные пары в длину, 17-21 нуклеотидную пару в длину, 17-19 нуклеотидных пар в длину, 19-25 нуклеотидных пар в длину, 19-23 нуклеотидные пары в длину, 19-21 нуклеотидную пару в

длину, 21-25 нуклеотидных пар в длину или 21-23 нуклеотидные пары в длину. В другом примере дуплексная область выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину. Согласно предпочтительным вариантам реализации дуплексная область представляет собой 19-21 нуклеотидную пару в длину.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи может содержать одну или более областей липких концов или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Липкий конец может представлять собой 1-6 нуклеотидов в длину, например, 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Согласно предпочтительным вариантам реализации область нуклеотидного липкого конца представляет собой 2 нуклеотида в длину. Липкие концы могут быть получены в результате того, что одна цепь длиннее другой, или в результате того, что две цепи одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием шпильки или с помощью других линкеров, не содержащих оснований.

Согласно одному варианту реализации каждый из нуклеотидов в области липкого конца агента РНКи может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включающий, но не ограничивающийся указанным, 2'-сахар-модифицированный, такой как 2-F, 2'-О-метил, тимидин (Т) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой последовательность липкого конца для любого конца на любой цепи. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность.

5'-или 3'-липкие концы на смысловой цепи, антисмысловой цепи или на обеих цепях агента РНКи могут быть фосфорилированы. Согласно некоторым вариантам реализации область(области) липкого конца содержит два нуклеотида, имеющих фосфотиоат между двумя нуклеотидами, причем указанные два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. Согласно одному варианту реализации липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. Согласно одному варианту реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в смысловой цепи.

Агент РНКи может содержать только один липкий конец, который может усиливать интерференционную активность РНКи, не влияя на ее общую стабильность. Например, одноцепочечной липкий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Обычно антисмысловая цепь РНКи имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-

конце, и 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой липкий конец антисмысловой цепи способствуют загрузке направляющей цепи в процесс RISC.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 19 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 20 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 21 нуклеотид в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит 21-нуклеотидную смысловую цепь и 23-нуклеотидную антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 с 5'-конца; указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца, при этом один конец агента РНКи является тупым, в то время как другой конец содержит 2-нуклеотидный липкий конец. Предпочтительно 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи. Если 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи, могут существовать две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, причем два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды липкого конца, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Согласно одному варианту реализации агент РНКи дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. Согласно одному варианту реализации каждый остаток независимо модифицирован с

использованием 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в чередующемся мотиве. Необязательно агент РНКи дополнительно содержит лиганд (например, липофильный лиганд, необязательно C16-лиганд).

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит смысловую и антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь представляет собой 25-30 нуклеотидных остатков в длину, причем, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; указанная антисмысловая цепь представляет собой 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью с образованием тем самым 3'-одноцепочечного липкого конца из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, с образованием тем самым одноцепочечного 5'-липкого конца из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, если смысловые и антисмысловые цепи выравнены для обеспечения максимальной комплементарности, с образованием тем самым по существу дуплексной области между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной целевой РНК вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит смысловую и антисмысловую цепи, причем указанный агент РНКи содержит первую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 с 5'-конца; при этом 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь длиннее на 1-4 нуклеотида на своем 3'-конце, чем первая цепь, при этом указанная дуплексная область представляет собой по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, и вторая цепь является достаточно комплементарной целевой мРНК вдоль по меньшей мере 19 нуклеотида по длине второй цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении агента РНКи в клетку млекопитающего, и при этом расщепление Dicer агента РНКи преимущественно приводит к образованию киРНК,

содержащей 3'-конец второй цепи, что снижает экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно агент РНКи дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления в смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь агента РНКи также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

В случае агента РНКи, имеющего дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи, как правило, находится около 10, 11 и 12 положений с 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут возникать в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца антисмысловой цепи, или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в соответствии с длиной дуплексной области РНКи с 5'-конца.

Смысловая цепь агента РНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления указанной цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или рядом с ним указанной цепи. Если смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выравнены так, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеют по меньшей мере однонуклеотидное перекрытие, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться, или все три нуклеотида могут перекрываться.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может возникать в сайте расщепления цепи или вблизи него указанной цепи, и другие мотивы могут представлять собой модификацию «крыла». Термин «модификация крыла» в настоящем документе относится к мотиву, возникающему в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него той же цепи. Модификация «крыла» либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или более нуклеотидами. Если мотивы являются непосредственно смежными друг с другом, то химическая структура мотивов отличается друг от друга, и если мотивы разделены одним или более нуклеотидами, химическая

структура может быть одинаковой или разной. Могут присутствовать две или более модификаций «крыла». Например, при наличии двух модификаций «крыла» каждая модификация «крыла» может возникать на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или вблизи него, или по обеим сторонам от основного мотива.

Как и смысловая цепь, антисмысловая цепь агента РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления указанной цепи или вблизи него. Указанная антисмысловая цепь также может содержать одну или более модификаций «крыла», расположение которых сходно с модификациями «крыла», которые могут присутствовать на смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента РНКи, как правило, не включает один или два первых концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

Согласно другому варианту реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента РНКи, как правило, не включает один или два первых спаренных нуклеотида в пределах дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи содержит по меньшей мере одну модификацию «крыла», то модификации «крыла» могут попадать на один и тот же конец дуплексной области и могут иметь перекрывание одного, двух или трех нуклеотидов.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи содержит по меньшей мере две модификации «крыла», смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть настолько выравнены, что две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на один конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на другой конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации одной цепи приходятся на каждую сторону основного мотива с перекрыванием одного, двух, или три нуклеотидов в дуплексной области.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит несовпадение(я) с мишенью, в пределах дуплекса, или их комбинации. Несовпадение может возникать в области липкого конца или дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании ее склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также можно использовать анализ следующей соседней пары или сходный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: A:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее, чем G:C; и I:C предпочтительнее, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем

документе) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (A:T, A:U, G:C) парами; и пары, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими парами.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей с 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы: A:U, G:U, I:C, и несовпадающие пары, например, неканонические пары или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

Согласно одному варианту реализации нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексной области с 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Согласно другому варианту реализации нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Согласно другому варианту реализации нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Согласно одному варианту реализации существует короткая последовательность дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации смысловая последовательность может быть представлена формулой (I):



где:

каждый i и j независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p и q независимо представляет собой 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

причем N_b и Y не имеют одинаковой модификации; и

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

Согласно одному варианту реализации N_a или N_b содержит модификации в чередующемся порядке.

Согласно одному варианту реализации мотив YYY возникает в сайте расщепления смысловой цепи или вблизи него. Например, если агент РНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив YYY может возникать в сайте расщепления или в непосредственной близости от него (например, может возникать в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, начиная отсчет с 1 нуклеотида с 5'-конца; или необязательно начиная отсчет с 1 спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 1 и j представляет собой 0, или i представляет собой 0 и j представляет собой 1, или как i , так и j представляют собой 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

5' n_p - N_a -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_a - n_q 3' (Ic); или

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Id).

Если смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов.

Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличающимся друг от друга.

Согласно другим вариантам реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:

5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3' (Ia).

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

Согласно одному варианту реализации последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):

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

где:

каждый k и l независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p' и q' независимо представляет собой 0-6;
 каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

причем N_b' и Y' не имеют одинаковой модификации; и

и

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

Согласно одному варианту реализации N_a' или N_b' содержат модификации в чередующемся порядке.

Мотив $Y'Y'Y'$ возникает в сайте расщепления антисмысловой цепи или вблизи него. Например, если агент РНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив $Y'Y'Y'$ может возникать в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца. Предпочтительно мотив $Y'Y'Y'$ возникает в положениях 11, 12, 13.

Согласно одному варианту реализации мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМe-модифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации k представляет собой 1 и 1 представляет собой 0, или k представляет собой 0 и 1 представляет собой 1, или как k , так и 1 представляют собой 1.

Таким образом, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p', 3' \text{ (IIb)}$;

$5' n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p', 3' \text{ (IIc)}$; или

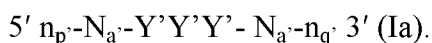
$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p', 3' \text{ (IId)}$.

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

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

Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Согласно другим вариантам реализации k представляет собой 0 и 1 представляет собой 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



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

Каждый из X' , Y' и Z' может быть одинаковым или отличающимся друг от друга.

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован с использованием LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-гидроксил или 2'-фтор. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метил или 2'-фтор. Каждый X , Y , Z , X' , Y' и Z' , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

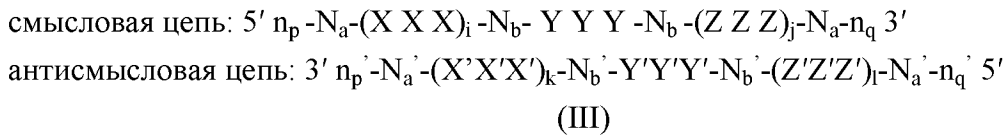
Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи может содержать мотив YYY , возникающий в 9, 10 и 11 положениях цепи, если дуплексная область представляет собой 21 нуклеотид, начиная отсчет от 1-го нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве модификаций «крыла» на противоположном конце дуплексной области; и каждый XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь может содержать мотив $Y'Y'Y'$, возникающий в положениях 11, 12, 13 цепи, начиная отсчет от 1-го нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет от 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метильную модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив $X'X'X'$ или мотивы $Z'Z'Z'$ в качестве модификаций «крыла» на противоположном конце дуплексной области; и каждый $X'X'X'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Соответственно, агенты РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая

цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов, при этом указанный дуплекс РНКи представлен формулой (III):



где:

каждый i, j, k и l независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p, p', q и q' независимо представляет собой 0-6;

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

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

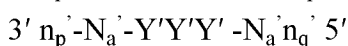
где

каждый n_p', n_p, n_q' и n_q , каждый из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет собой нуклеотид липкого конца; и

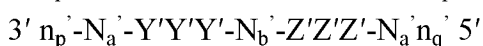
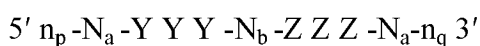
каждый XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0; или i представляет собой 1 и j представляет собой 0; или i представляет собой 0 и j представляет собой 1; или как i , так и j представляют собой 0; или как i , так и j представляют собой 1. Согласно другому варианту реализации k представляет собой 0 и l представляет собой 0; или k представляет собой 1 и l представляет собой 0; или k представляет собой 0 и l представляет собой 1; или как k , так и l представляют собой 0; или как k , так и l представляют собой 1.

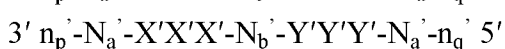
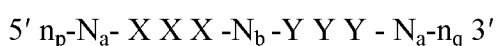
Примерные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс РНКи, включают формулы ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIIId)

Если агент РНКи представлен формулой (IIIa), каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIb), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIId), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в чередующемся порядке.

Согласно одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор. Согласно другому варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, и $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. Согласно еще одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более C16 (или родственными) фрагментами, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). Согласно другому варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIId), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами, например, C16-фрагментами (или родственными), необязательно присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIa), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной

связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами, например, C16-фрагментами (или родственными), присоединенным посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

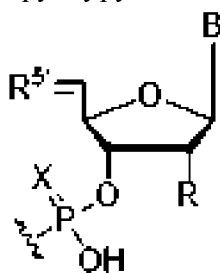
Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту реализации два агента РНКи, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце и одним или обоим из 3'-концов и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные агенты РНКи, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520 и US 7858769, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента РНКи, описанного в настоящем документе. Согласно примерным вариантам реализации модифицированный 5'-винилфосфонатом нуклеотид согласно настоящему изобретению имеет структуру:



где X представляет собой O или S;

R представляет собой водород, гидроксиль, фтор или C_{1-20} алкокси (например, метокси или *n*-гексадецилокси);

$R^{5'}$ представляет собой $=C(H)-P(O)(OH)_2$ и двойная связь между $C5'$ -углеродом и $R^{5'}$ находится в ориентации *E* или *Z* (например, ориентации *E*); и

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

Согласно одному варианту реализации $R^{5'}$ представляет собой $=C(H)-P(O)(OH)_2$, и двойная связь между $C5'$ -углеродом и $R^{5'}$ находится в ориентации *E*. Согласно другому варианту реализации R представляет собой метокси, и $R^{5'}$ представляет собой $=C(H)-P(O)(OH)_2$, и двойная связь между $C5'$ -углеродом и $R^{5'}$ находится в ориентации *E*. Согласно другому варианту реализации X представляет собой S, R представляет собой метокси, и $R^{5'}$ представляет собой $=C(H)-P(O)(OH)_2$, и двойная связь между $C5'$ -углеродом и $R^{5'}$ находится в ориентации *E*.

Винилфосфонат согласно настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам реализации винилфосфонат согласно настоящему изобретению присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК.

Модификации винилфосфатом также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему изобретению. Примерная структура винилфосфата включает предшествующую структуру, где $R^{5'}$ представляет собой $=C(H)-OP(O)(OH)_2$, и двойная связь между $C5'$ -углеродом и $R^{5'}$ находится в ориентации *E* или *Z* (например, ориентации *E*).

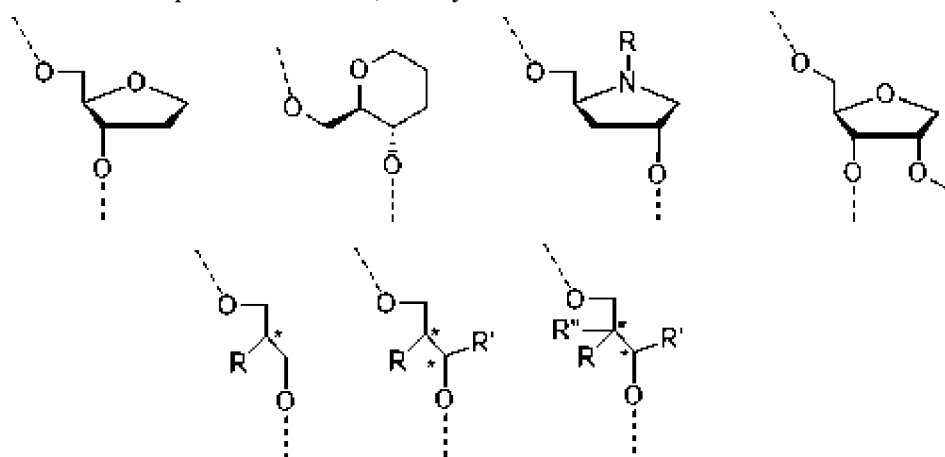
i. Термически дестабилизирующие модификации

Согласно определенным вариантам реализации молекулу дцРНК можно оптимизировать для РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 5'-конца антисмысловой цепи) для снижения или ингибирования сайленсинга нецелевого гена. Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, отсчитывая от 5'-конца, антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью сайленсинга нецелевого гена. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или предпочтительно в положениях 4-8 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически

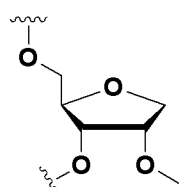
дестабилизирующая(ие) модификация(ии) дуплекса расположена(ы) в положении 6, 7 или 8 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 с 5'-конца антисмысловой цепи. Термин «термически дестабилизирующая модификация(ии)» включает модификацию(ии), которая приведет к получению дцРНК с более низкой общей температурой плавления (T_m) (предпочтительно T_m на один, два, три или четыре градуса ниже T_m дцРНК без такой модификации(ий)). Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 с 5'-конца антисмысловой цепи.

Термически дестабилизирующие модификации могут включать, но не ограничиваются перечисленными, модификацию путем удаления азотистого основания; несовпадение с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксификация, ациклический нуклеотид, например, неблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA); и 2'-5'-связанные рибонуклеотиды («3'-RNA»).

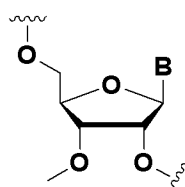
Примерные модификации путем удаления азотистого основания включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие:



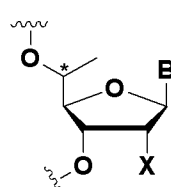
где $R=H$, Me, Et или OMe; $R'=H$, Me, Et или OMe; $R''=H$, Me, Et или OMe



**Mod2 (2'-OMe
спейсер без
азотистого
основания)**

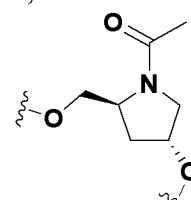


Mod3 (3'-OMe)

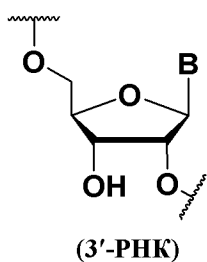


Mod4 (5'-Me)

X = OMe, F

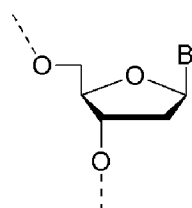


**Mod5 (Нур-
спейсер)**

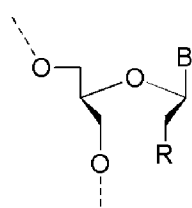


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

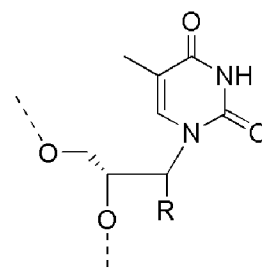
Примерные модификации сахара включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие:



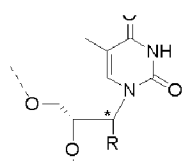
2'-дезоксид



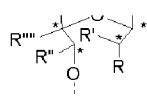
Неблокированная
нуклеиновая кислота
R = H, OH, O-алкил



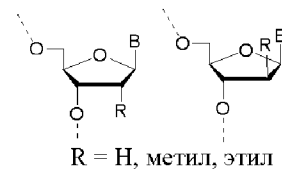
Гликолевая
нуклеиновая кислота
R = H, OH, O-алкил



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



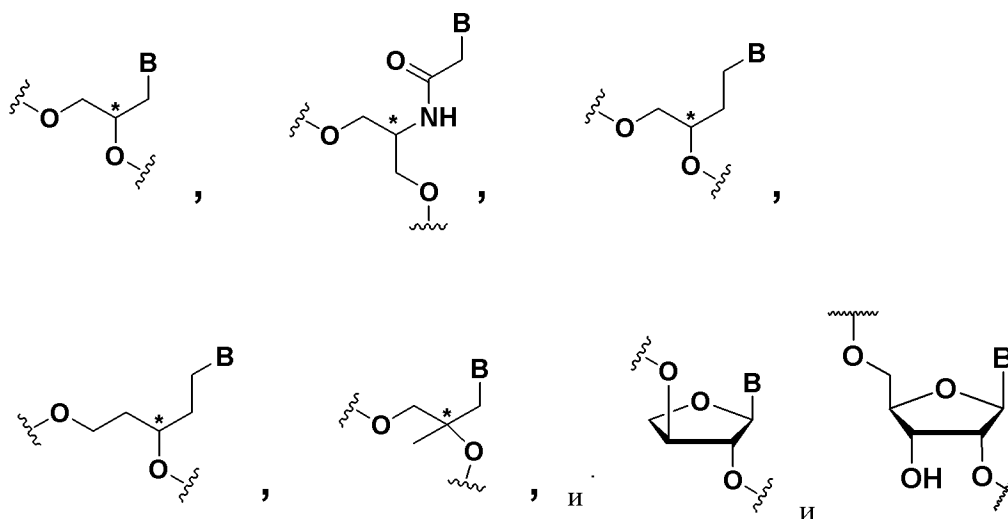
Неблокированная нуклеиновая кислота
R = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-алкил, NH₂, NHMe, NMe₂
R' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-алкил, NH₂, NHMe, NMe₂
R'' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-алкил, NH₂, NHMe, NMe₂
R''' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-алкил, NH₂, NHMe, NMe₂
R'''' = H, OH, CH₃, CH₂CH₃, O-алкил, NH₂, NHMe, NMe₂



R = H, метил, этил

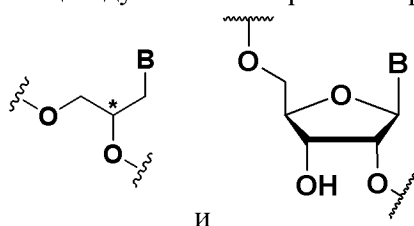
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



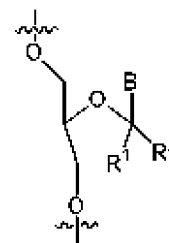
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, либо *S*, либо *рацемат*.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

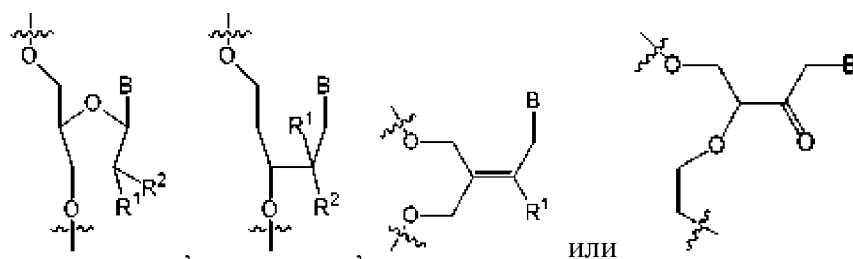


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка представляет собой либо *R*, либо *S*, либо *рацемат* (например, *S*).

Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду, имеющему ациклический рибозный сахар, например, в котором любая из связей между углеродами рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует или по меньшей мере один из атомов углерода или кислорода рибозы (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. Согласно некоторым

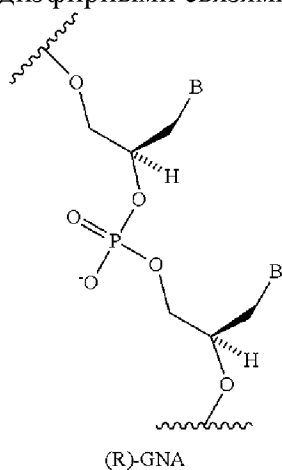


вариантам реализации ациклический нуклеотид представляет собой



, 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). Термин «UNA» относится к неблокированной ациклической нуклеиновой кислоте, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием неблокированного «сахарного» остатка. В одном примере UNA также включает мономеры, в которых удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1'- и C4'-углеродами). В другом примере связь C2'-C3' (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между C2'- и C3'-углеродами) сахара удалена (см. Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не влияя на спаривания по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством 2'-5'-связи или 3'-5'-связи.

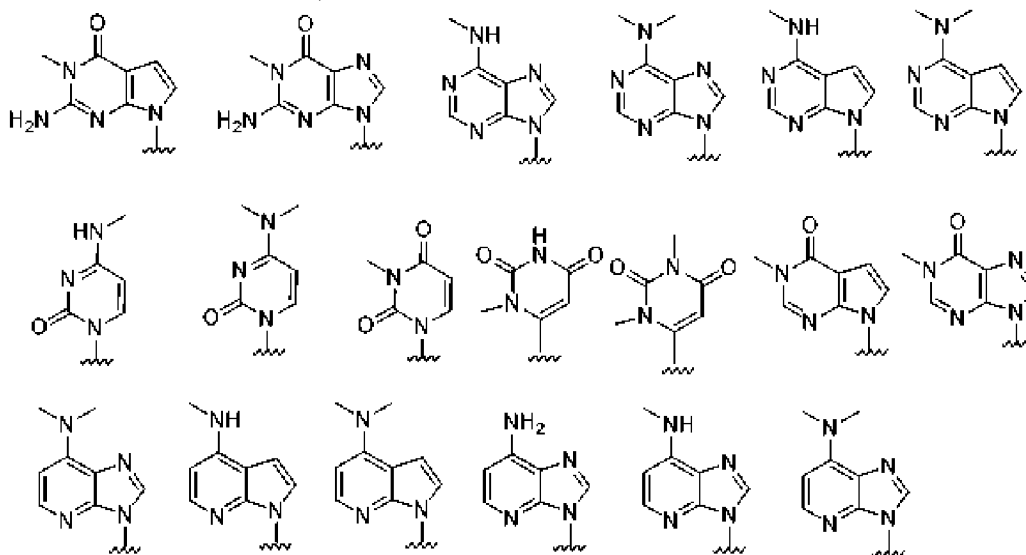
Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, сходный с ДНК или РНК, но отличающийся по композиции его «остова» тем, что он состоит из повторяющихся глицериновых звеньев, связанных фосфодиэфирными связями:



Термически дестабилизирующая модификация дуплекса может представлять собой несовпадения (т. е. некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи в пределах дуплекса дцРНК. Примерные несовпадающие 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

несовпадающие пары оснований, известные в данной области техники, также являются приемлемыми для настоящего изобретения. Несовпадение может возникать между нуклеотидами, которые являются либо встречающимися в природе нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, т. е. несовпадение спаривания оснований может возникать между нуклеиновыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций на рибозных сахарах нуклеотидов. Согласно определенным вариантам реализации молекула дцРНК содержит по меньшей мере одно нуклеиновое основание с несовпадающим спариванием, которое представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание; например, 2'-дезоксинуклеиновое основание находится в смысловой цепи.

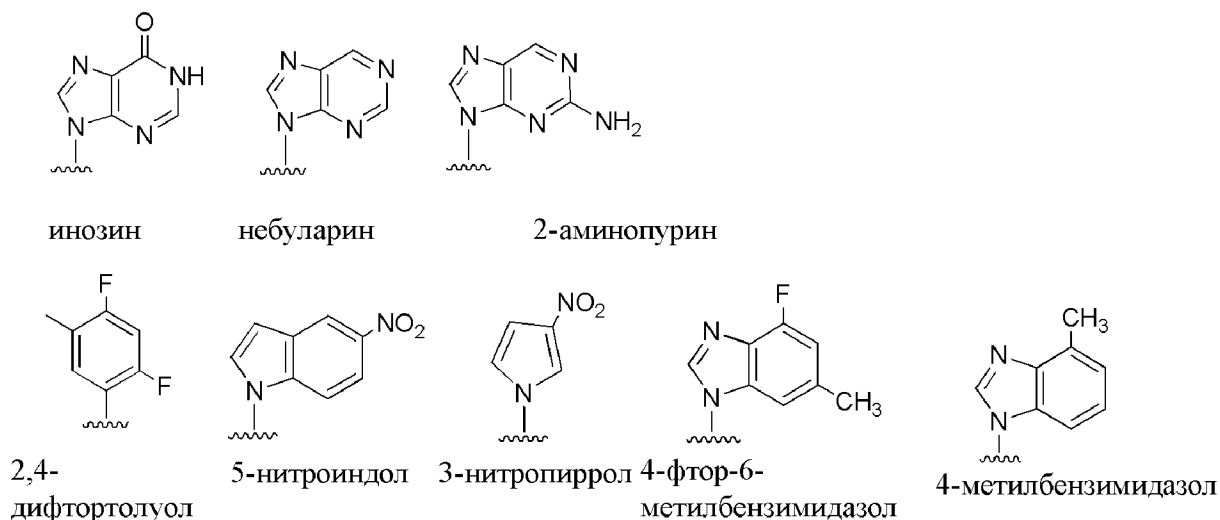
Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает нуклеотиды с нарушенным образованием водородных связей по Уотсону-Крику с комплементарным основанием на целевой мРНК, такие как:



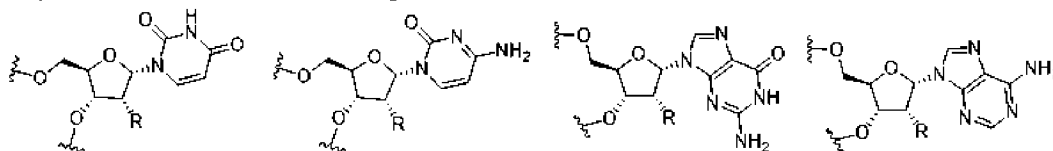
Дополнительные примеры лишнего азотистого основания нуклеотида, ациклических нуклеотидных модификаций (включая UNA и GNA) и модификаций, приводящих к несовпадению, подробно описаны в WO 2011/133876, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Термически дестабилизирующие модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями и модификации фосфата.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, например, но не ограничиваясь этим, модификации нуклеиновых оснований с нарушенной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Указанные модификации нуклеиновых оснований оценивали в отношении дестабилизации центральной области дуплекса дцРНК, как описано в WO 2010/0011895, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Примерные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:

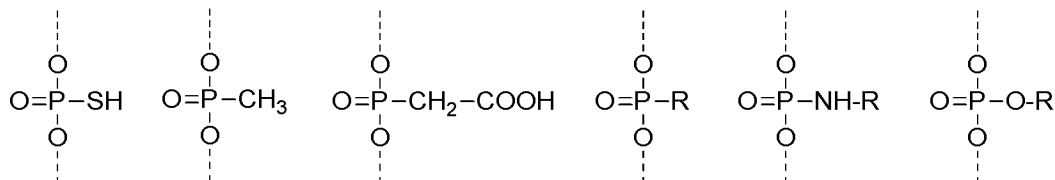


Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает один или более α -нуклеотидов, комплементарных основанию на целевой мРНК, таких как:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

Примерные модификации фосфата, которые, как известно, уменьшают термическую стабильность дуплексов дцРНК по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, представляют собой:



R = алкил

Алкил для группы R может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, но не ограничиваются перечисленными, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Специалист в данной области техники поймет, что функциональная роль нуклеиновых оснований определяет специфичность агента РНКи согласно настоящему изобретению, в то время как модификации нуклеиновых оснований можно выполнять различными способами, описанными в настоящем документе, например, для введения дестабилизирующих модификаций в агент РНКи согласно настоящему изобретению, например, с целью усиления целевого эффекта относительно нецелевого эффекта, и что диапазон доступных модификаций и в целом присутствующих на агентах РНКи согласно настоящему изобретению, как правило, является намного большим для ненуклеиновых модификаций, например, модификаций сахарных групп или фосфатных остовов полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах

настоящего изобретения и явным образом предусмотрены для агентов РНКи согласно настоящему изобретению, имеющих нативные нуклеиновые основания или модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше или в другом месте в настоящем документе.

В дополнение к антисмысловой цепи, содержащей термически дестабилизирующую модификацию, дцРНК также может содержать одну или более стабилизирующих модификаций. Например, дцРНК может содержать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, все стабилизирующие модификации могут присутствовать в одной цепи. Согласно некоторым вариантам реализации как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь содержат по меньшей мере две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат стабилизирующую модификацию в чередующемся порядке. Чередующийся порядок стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся порядок стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка стабилизирующих модификаций на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, смежную с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующая модификация может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию на каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две стабилизирующие модификации на 3'-конце дестабилизирующей

модификации, т. е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация в смысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь не содержит стабилизирующей модификации в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Примерные термически стабилизирующие модификации включают, но не ограничиваются перечисленными, 2'-фтор-модификации. Другие термически стабилизирующие модификации включают, но не ограничиваются перечисленными, LNA.

Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, все 2'-фторнуклеотиды могут присутствовать в одной цепи. Согласно некоторым вариантам реализации как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь содержат по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат 2'-фтор-модификации в чередующемся порядке. Чередующийся порядок 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся порядок 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка 2'-фтор-модификаций на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации

антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотид на каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида на 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в смысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех 2'-фторнуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотида в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (нт.) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (нт.), причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид возникает в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), при этом один конец дцРНК является тупым, в то время как другой конец содержит липкий конец из 2

нуклеотидов, и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. Предпочтительно 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловые цепи, причем: указанная смысловая цепь представляет собой 25-30 нуклеотидных остатков в длину, при этом, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 указанной смысловой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; указанная антисмысловая цепь представляет собой 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи, образуют дуплекс; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью с образованием тем самым 3'-одноцепочечного липкого конца из 1-6 нуклеотидов; при этом указанный 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, с образованием тем самым одноцепочечного 5'-липкого конца из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, если смысловая и антисмысловая цепи выравнены для обеспечения максимальной комплементарности, с образованием тем самым по существу дуплексной области между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является в достаточной степени комплементарной целевой РНК вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи). Например, термически дестабилизирующий нуклеотид возникает между положениями, противоположными или комплементарными положениям 14-17 5'-конца смысловой цепи, и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с

лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-30 нуклеотидных пар в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, причем указанная молекула дцРНК содержит смысловую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированный нуклеотид, который восприимчив к ферментативной деградации, в положении 11 с 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой цепи и 5'-конец указанной антисмысловой цепи образуют тупой конец, и указанная антисмысловая цепь длиннее на 1-4 нуклеотида на своем 3'-конце, чем смысловая цепь, при этом длина дуплексной области составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая цепь является достаточно комплементарной целевой мРНК вдоль по меньшей мере 19 нуклеотидов по длине указанной антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной молекулы дцРНК в клетку млекопитающего, и при этом расщепление Dicer указанной дцРНК преимущественно приводит к образованию киРНК, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой цепи, что снижает экспрессию целевого гена у млекопитающего, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом указанный по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК имеет дуплексную область из 12-29 нуклеотидных пар в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи молекулы дцРНК может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или разной модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих несвязывающих кислородов фосфата или одного или более связывающих кислородов фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2' гидроксила на рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента «дефосфо»-линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания; и замену или модификацию остова рибоза-фосфат.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц,

многие из модификаций возникают в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатного фрагмента, или несвязывающего О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет возникать во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не возникнет. В качестве примера модификация может возникать только в 3'- или 5'-концевом положении, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может возникать в двухцепочечной области, в одноцепочечной области или в обеих областях. Модификация может возникать только в двухцепочечной области РНК или может возникать только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении несвязывающего О может возникать только на одном или на обоих концах, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может возникать в двухцепочечной и одноцепочечной областях, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Можно, например, повысить стабильность, включить конкретные основания в липкие концы или включать модифицированные нуклеотиды или суррогаты нуклеотидов в одноцепочечные липкие концы, например, в 5'-или 3'-липкий конец или в оба конца. Например, может быть желательным включение пуриновых нуклеотидов в липкие концы. Согласно некоторым вариантам реализации все или некоторые основания в 3'- или 5'-липком конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных, вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификаций в фосфатной группе, например, фосфотиоатных модификаций. Липкие концы не обязательно должны быть гомологичны целевой последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-дезоксид или 2'-фтор. Цепи могут содержать более одной модификации. Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метил или 2'-фтор. Следует понимать, что эти модификации дополняют по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, присутствующую в антисмысловой цепи.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют на смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут представлять собой 2'-дезоксид, 2'-О-метил или 2'-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие. Согласно некоторым вариантам реализации каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метил или 2'-

дезокси. Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метилнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксидефторнуклеотида, 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA)-нуклеотида, 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE)-нуклеотида, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP)-нуклеотида или 2'-ара-Ф-нуклеотида. Как уже упоминалось, следует понимать, что эти модификации дополняют по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, присутствующую в антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит модификации в чередующемся порядке, в частности, в областях В1, В2, В3, В1', В2', В3', В4'. Термин «чередующийся мотив» или «чередующийся порядок» в контексте настоящего документа относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, при этом каждая модификация возникает на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному из каждого второго нуклеотида или к одному из каждых трех нуклеотидов или к подобному порядку. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВВВВВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...», и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации на нуклеотиде, то чередующийся порядок, т. е. модификации на каждом втором нуклеотиде могут быть одинаковыми, но каждая из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможностей модификаций в пределах чередующегося мотива, такого как «АВАВАВ...», «АСАСАС...» «ВДВДВД...» или «СДСДСД...», и т. д.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению имеет сдвиг профиля модификации для чередующегося мотива на смысловой цепи относительно профиля модификации для чередующегося мотива на антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует по-иному модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, при спаривании смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» с 3'-5' цепи в пределах дуплексной области. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» с 3'-5' цепи в пределах дуплексной области так, что существует полный или частичный сдвиг профилей модификаций между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный

рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В другом конкретном примере чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5'-цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

Молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или на обеих цепях в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат модификации межнуклеотидных связей в чередующемся порядке. Чередующийся порядок модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся порядок модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК содержит фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области липкого конца. Например, область липкого конца содержит два нуклеотида, имеющих фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Также могут быть выполнены модификации межнуклеотидных связей для связывания нуклеотидов липких концов с концевыми спаренными нуклеотидами в

пределах дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды липкого конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут существовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид липкого конца со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидом липкого конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут существовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, в которых два из трех нуклеотидов являются нуклеотидами липкого конца и третий представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Предпочтительно, указанные три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь молекулы дцРНК содержит 1-10 блоков из двух-десяти 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, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК 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, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК 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, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК 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, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из шести фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из семи фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из восьми фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или

антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из девяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или на обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 нуклеотидов внутренней области дуплекса каждой из смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной, метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8-16 дуплексной области, отсчитывая от 5'-конца смысловой цепи; молекула дцРНК может необязательно дополнительно содержать одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положения 18-23 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положения 1-5 и одну фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положения 18-23 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца), и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные или метилфосфонатные

фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 21 и 22 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 22 и 23 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой цепи (отсчитывая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению имеет некоторый профиль хиральных центров остова. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 6 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 7 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 8

[illegible]

[illegible]

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. Согласно некоторым вариантам реализации блок представляет собой блок Rp в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. Согласно некоторым

вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Rp. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Rp. Согласно некоторым вариантам реализации блок представляет собой блок Sp в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Sp. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат как блоки Rp, так и блоки Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков Rp, но не содержат блоки Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков Sp, но не содержат блоки Rp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков PO, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой блок Sp, в котором каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит некоторый тип нуклеозида в области или за олигонуклеотидом

следует конкретный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, Rp-хиральная межнуклеотидная связь, Sp-хиральная межнуклеотидная связь и т. д. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за U следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за U следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за U следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за С следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за С следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за С следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за G следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за G следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за G следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за С и U следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за С и U следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за С и U следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за А и G следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за А и G следует Rp.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 нуклеотидных пар в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из

следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 нуклеотидных пар в длину; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 нуклеотидных пар в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 нуклеотидных пар в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 нуклеотидных пар в длину; и (vii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит несовпадение(я) с мишенью, в пределах дуплекса или их комбинации. Несовпадение может возникать в области липкого конца или в дуплексной

области. Пару оснований можно ранжировать на основании ее склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также можно использовать анализ следующей соседней пары или сходный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: A:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее, чем G:C; и I:C предпочтительнее, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем документе) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (A:T, A:U, G:C) парами; и пары, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими парами.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей с 5'-конца антисмысловой цепи, которая может быть независимо выбрана из группы: A:U, G:U, I:C, и несовпадающие пары, например, неканонические пары или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи, на 5'-конце дуплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексной области с 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце фосфодиэфирной (PO), фосфотиоатной (PS) или фосфодитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении одноцепочечного или двухцепочечного олигонуклеотида может оказывать стерический эффект на межнуклеотидную связь и, следовательно, защищать или стабилизировать ее против нуклеаз.

Согласно некоторым вариантам реализации 5'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Например, 5'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Алкильная группа в 5'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Например, 4'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце

динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Алкильная группа в 4'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. В качестве альтернативы 4'-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. 4'-*O*-алкил рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцРНК. 5'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцРНК. 4'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцРНК. 5'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может содержать 2'-5'-связи (с 2'-Н, 2'-ОН и 2'-ОМе и с Р=О или Р=С). Например, модификации 2'-5'-связей можно применять, чтобы способствовать устойчивости к нуклеазе или ингибировать связывание смысловой цепи с антисмысловой цепью или можно применять на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи под действием RISC.

Согласно другому варианту реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-Н, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, эти модификации L-сахаров можно применять, чтобы способствовать устойчивости к нуклеазе или ингибировать связывание смысловой цепи с антисмысловой цепью, или можно применять на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи под действием RISC.

В различных публикациях описана мультимерная киРНК, которую всю можно применять с дцРНК согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, US 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые полностью включены в настоящий документ.

Как более подробно описано ниже, агент РНКи, который содержит конъюгаты одного или более углеводных фрагментов с агентом РНКи, может оптимизировать одно или более свойств агента РНКи. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице агента РНКи. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц агента на основе дцРНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называется в настоящем документе модифицированной субъединицей с заменой рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более атомов кольца могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. 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 систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну «точку присоединения к остову», предпочтительно две «точки присоединения к остову» и (ii) по меньшей мере одну «связывающую точку присоединения». «Точка присоединения к остову» в контексте настоящего документа относится к функциональной группе рибонуклеиновой кислоты, например, гидроксильной группе, или обычно к связи, доступной и подходящей для включения носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, содержащий серу, остов. «Связывающая точка присоединения» (ТАР) в некоторых вариантах реализации относится к составному атому кольца циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), который соединяет выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент соединен посредством промежуточной связки с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или обычно обеспечивает связь, которая подходит для включения или связывания другого химического соединения, например лиганда с составным кольцом.

Агенты РНКи могут быть конъюгированы с лигандом посредством носителя, причем указанный 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 сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно определенным конкретным вариантам реализации агент РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой агент, выбранный из группы агентов, перечисленных в любой из Таблиц 2-5. Указанные агенты могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению включает химическое связывание иРНК с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение указанной иРНК, например, в клетку. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются перечисленными, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Bior. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), простой тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Bior. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкохлестерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Согласно определенным вариантам реализации лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента иРНК, в которого он включен. Согласно некоторым вариантам реализации лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного или органного компартмента, ткани, органа или участка тела, по сравнению, например, с соединением, не имеющим такого лиганда. Типичные лиганды не будут участвовать в дуплексном спаривании в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL))

или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли-L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли-2-этилакриловую кислоту, полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примерные полиамины включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающий на клетки или ткани агент, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. Согласно определенным вариантам реализации лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие линкеры (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, пирен-1-масляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил, или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоактивной меткой маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилители транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола,

конъюгаты акридина и имидазола, комплексы Eu^{3+} тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или активатор NF- κ B.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента иРНК в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

Согласно некоторым вариантам реализации лиганд, присоединенный к иРНК, описанной в настоящем документе, действует в качестве модулятора фармакокинетики (модулятора ФК). Модуляторы ФК включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, связывающие белки агенты, PEG, витамины и т. д. Примерные модуляторы ФК включают, но не ограничиваются перечисленными, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфотиоатных связей, также связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды, состоящие из примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфотиоатных связей в остоле, также приемлемы для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве ФК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают сывороточные компоненты (например, сывороточные белки), также подходят для применения в качестве ФК-модулирующих лигандов в вариантах реализации, описанных в настоящем документе.

Конъюгированные с лигандами иРНК согласно настоящему изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, например, полученную в результате присоединения связывающей молекулы на олигонуклеотид (описано ниже). Указанный реактивный олигонуклеотид может быть подвергнут непосредственной реакции с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируются как несущие любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенный к

ним связывающий фрагмент.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, могут быть получены удобным и рутинным образом с помощью хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Фостер-Сити, Калифорния). Для такого синтеза можно дополнительно или альтернативно использовать любые другие средства, известные в данной области техники. Также известно, что подобные методики применяют для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и несущих молекулу лиганда специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидах согласно настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных нуклеотидных или нуклеозидных предшественников, или нуклеотидных или нуклеозидных конъюгированных предшественников, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотид или нуклеозид-конъюгат, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидных несущих лиганд строительных блоков.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгат, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов, как правило, завершают, а затем проводят реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые являются коммерчески доступными и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Липидные конъюгаты

Согласно определенным вариантам реализации лиганд или конъюгат представляет собой липид или основанную на липиде молекулу. Такой липид или основанная на липиде молекула, как правило, может связывать сывороточный белок, такой как сывороточный альбумин человека (HSA). Связывающий HSA лиганд обеспечивает возможность распределения конъюгата в целевую ткань, например, в отличную от почки целевую ткань организма. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхимальные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связываться с HSA, также можно применять в качестве лигандов. Например, можно применять напроксен или аспирин. Липид или основанный на липиде лиганд может (а) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, или (с) может применяться для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для модулирования, например, контроля (например, ингибирования) связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, будет менее вероятно нацелен на почку и, следовательно, менее вероятно, будет выведен из организма. Липид или лиганд на основе липида, который менее сильно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почку.

Согласно определенным вариантам реализации лиганд на основе липида связывает HSA. Например, лиганд может связывать HSA с достаточной аффинностью так, что распределение конъюгата в ткани, отличной от ткани почки, повышается. Однако аффинность, как правило, не настолько сильна, что связывание HSA и лиганда не может быть обращено.

Согласно определенным вариантам реализации лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или совсем не связывается так, что повышается распределение конъюгата в почку. Другие фрагменты, которые нацелены в клетки почки, также можно применять вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно применимы для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Примерные витамины включают витамины А, Е и К. Другие примерные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Агенты для проникновения в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, такой как спиральный агент для проникновения в клетку. Согласно определенным вариантам реализации агент является амфипатическим. Примерный агент представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если агент представляет собой пептид, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральный агент, как правило, представляет собой альфа-спиральный агент и может иметь липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную с природным пептидом. Присоединение пептида и пептидомиметиков к агентам иРНК может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, посредством усиления распознавания и всасывания клетками. Пептид или фрагмент пептидомиметика может иметь примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид для проникновения в клетки, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (MTS). Примерный гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 11). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 12)), содержащий гидрофобную MTS, также может представлять собой нацеливающий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид для «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Тат ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 13)) и белка *Antennapedia* дрозофил (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 14)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки «одна гранула-одно соединение» (ОВОС) (Lam *et al.*, *Nature*, 354:82-84, 1991). Как правило, пептид или пептидомиметик, присоединенный к агенту на основе дцПНК посредством включенного мономерного звена, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или направления конформационных свойств. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, чтобы облегчить нацеливание на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрина. Предпочтительные конъюгаты данного лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидный фрагмент RGD можно применять для нацеливания на конкретный тип клеток, например опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Пептид RGD может способствовать нацеливанию агента на основе дцПНК на опухоли из ряда других тканей, включая легкое, почку, селезенку или печень (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Как правило, пептид RGD будет способствовать нацеливанию агента РНКи на почку. Пептид RGD может быть линейным или циклическим и может быть

модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, чтобы способствовать нацеливанию на конкретные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять агент иРНК к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

«Пептид для проникновения в клетку» способен проникать в клетку, например, в микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающий в микробную клетку пептид может представлять собой, например, альфа-спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Serpin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид для проникновения в клетку также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид для проникновения в клетку может представлять собой двусоставной амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из слитого пептидного домена gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

С. Конъюгаты углеводов

Согласно некоторым вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению иРНК дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, описанных в настоящем документе. В настоящем документе «углевод» относится к соединению, которое представляет собой либо углевод *как таковой*, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединение, имеющее в качестве своей части углеводный фрагмент, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, каждое из которых содержит по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, содержащие два или три моносахаридных звена (например, C5, C6, C7 или C8).

Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат содержит моносахарид.

Согласно определенным вариантам реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в US 8106022, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно

некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc служит в качестве лиганда, который нацеливает иРНК на конкретные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc нацеливает иРНК на клетки печени, например, играя роль лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат содержит одно или более производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены посредством линкера, например, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 3'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 5'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе.

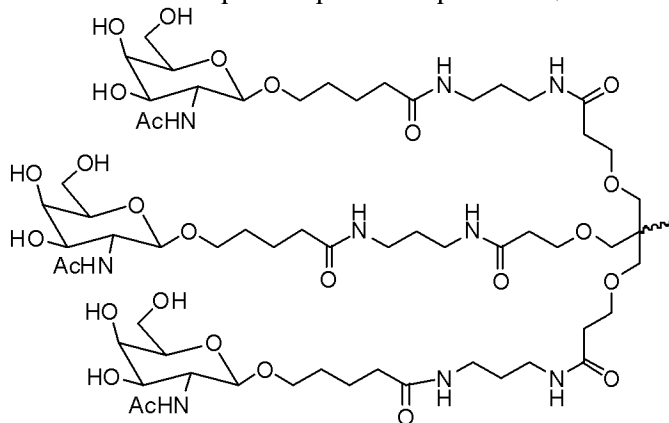
Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством тетравалентного линкера.

Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к агенту иРНК. Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНКи посредством множества одновалентных линкеров.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, когда две цепи агента РНКи согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлинненным липким концом в одной цепи дуплекса.

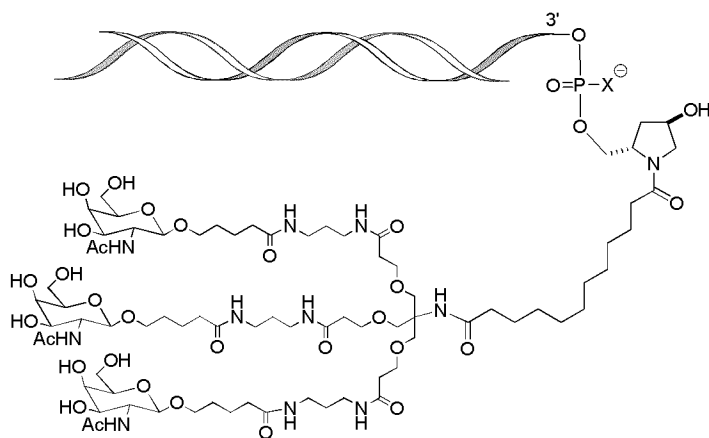
Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента РНКи согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлинённым липким концом в одной цепи дуплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc представляет собой

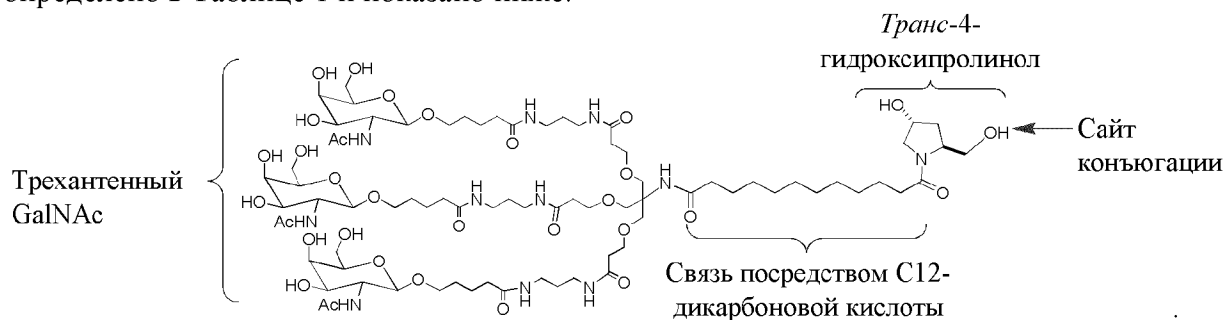


Формула II.

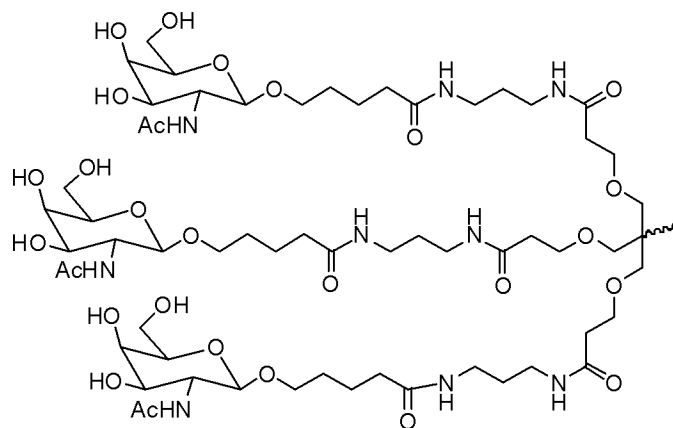
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи присоединен к углеводному конъюгату посредством линкера, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



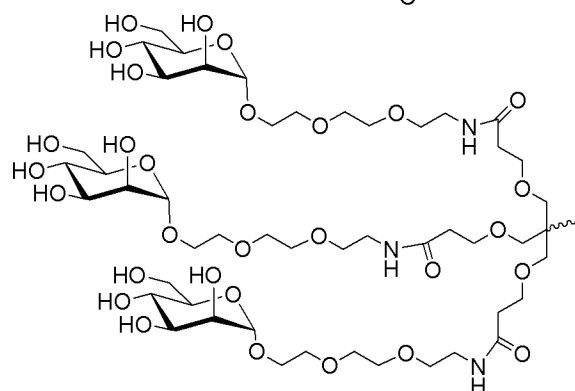
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи конъюгирован с L96, как определено в Таблице 1 и показано ниже:



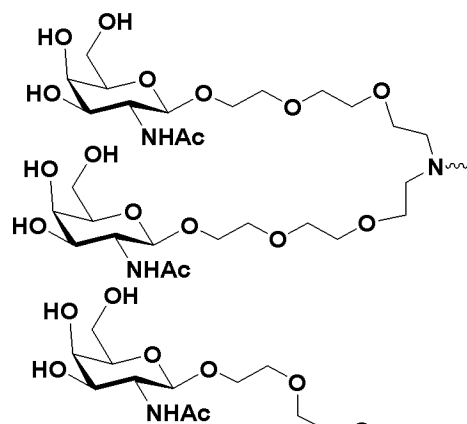
Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



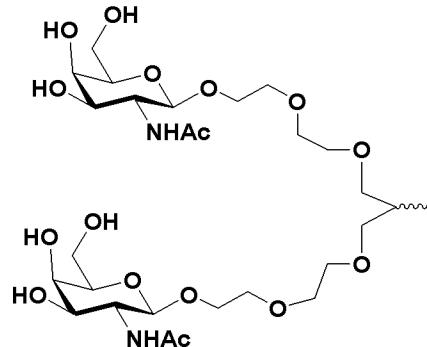
Формула II,



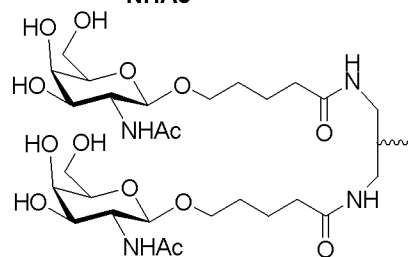
Формула III,



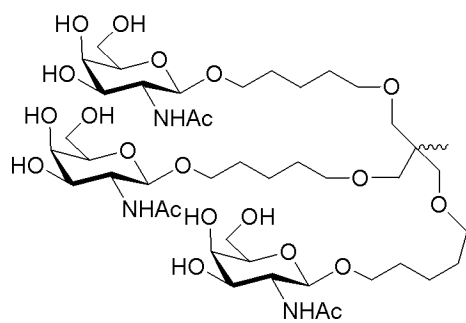
Формула IV,



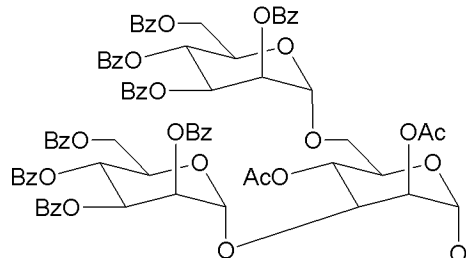
Формула V,



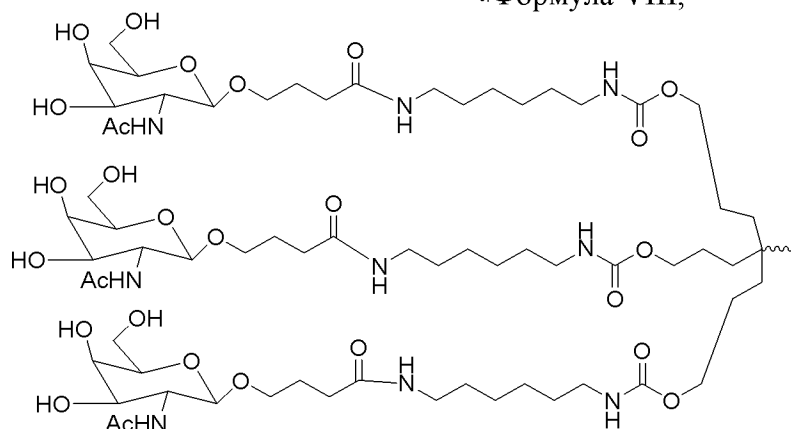
Формула VI,



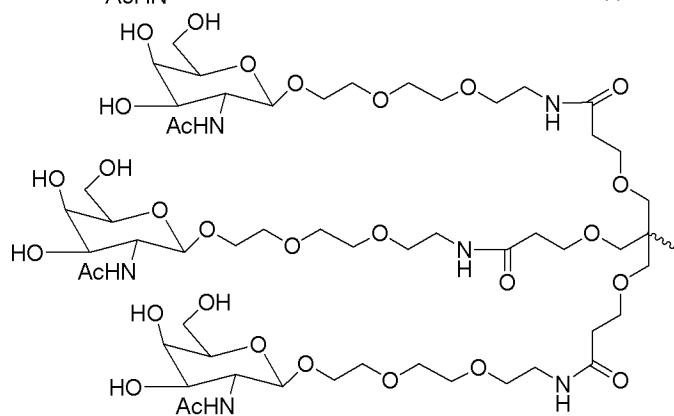
Формула VII,



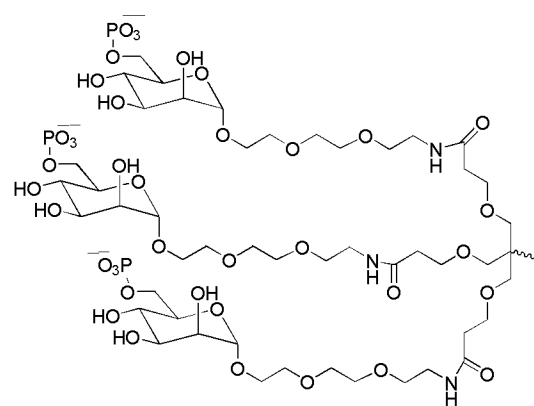
Формула VIII,



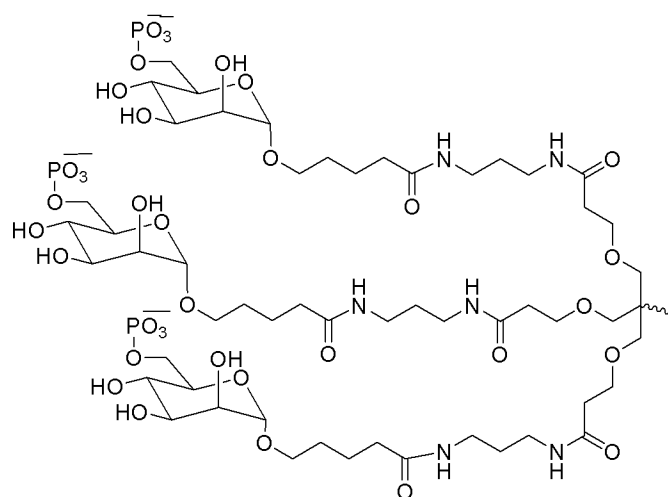
Формула IX,



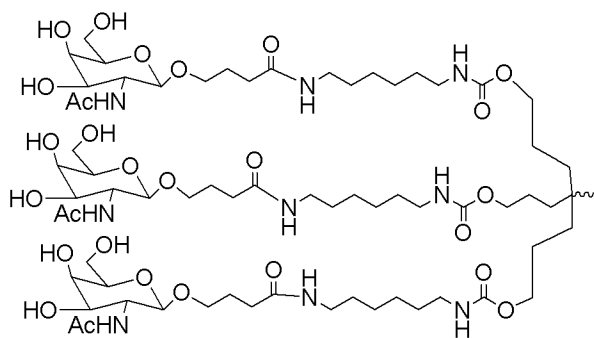
Формула X,



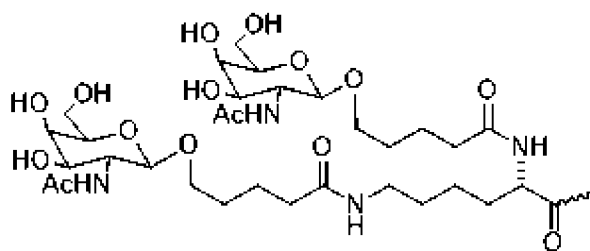
Формула XI,



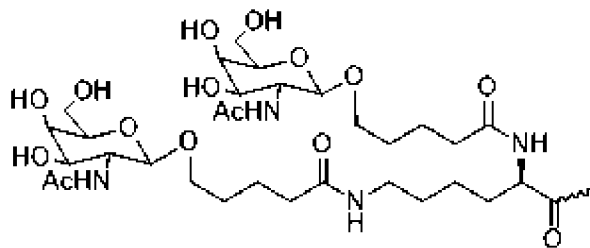
Формула XII,



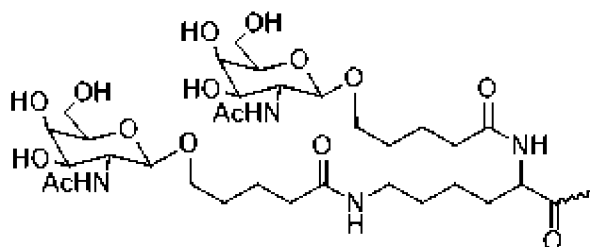
Формула XIII,



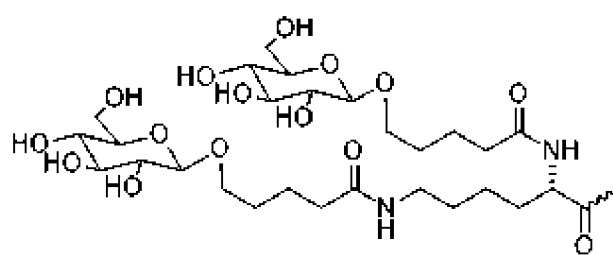
Формула XIV,



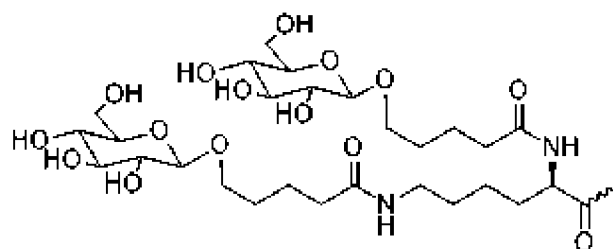
Формула XV,



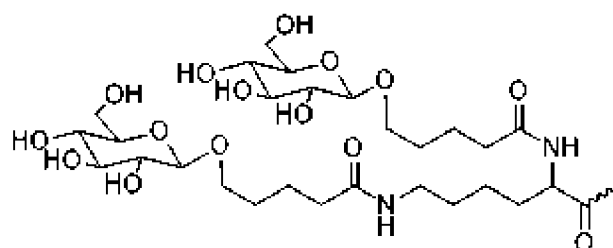
Формула XVI,



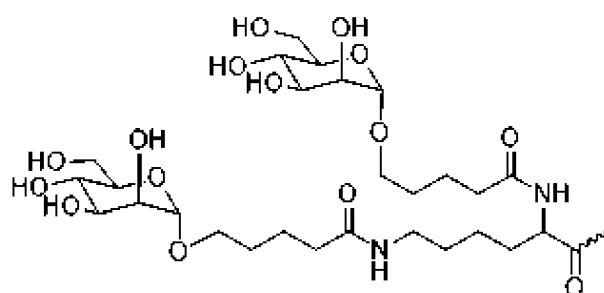
Формула XVII,



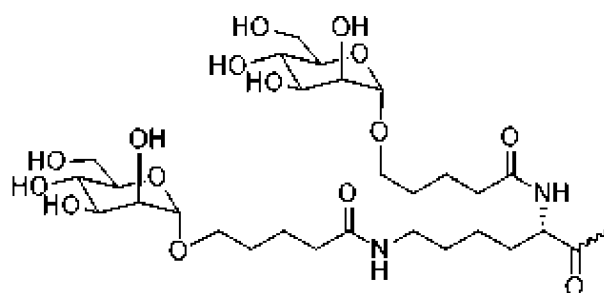
Формула XVIII,



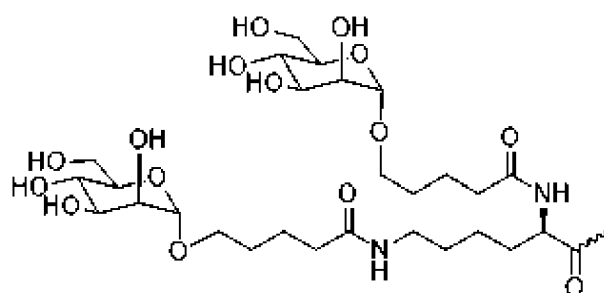
Формула XIX,



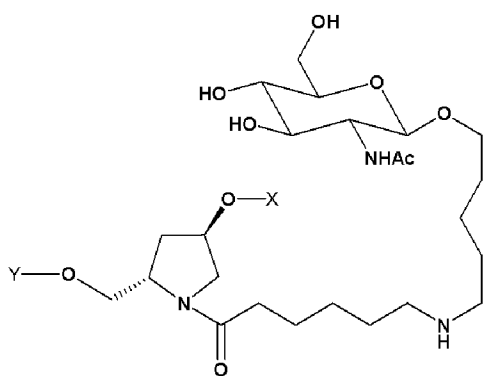
Формула XX,



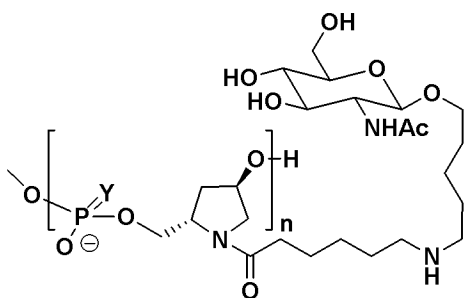
Формула XXI,



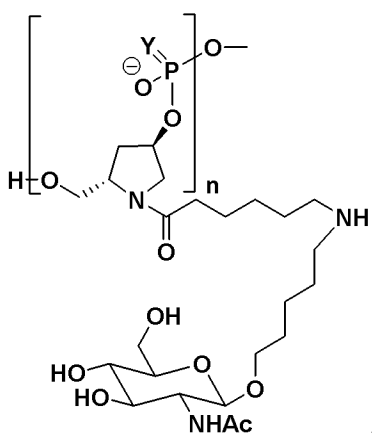
Формула XXII,



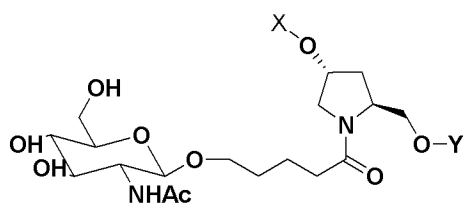
Формула XXIII;



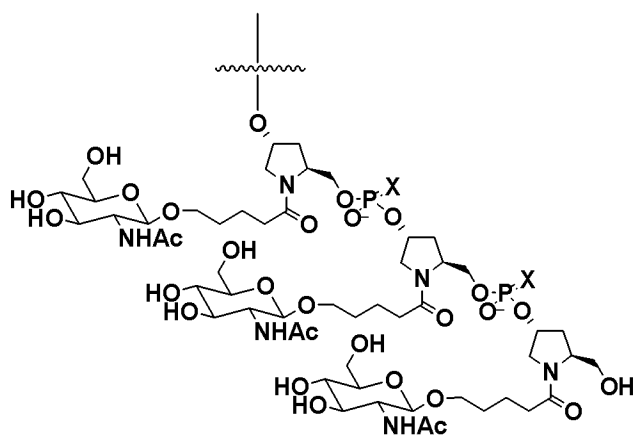
, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXIV);



, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXV);

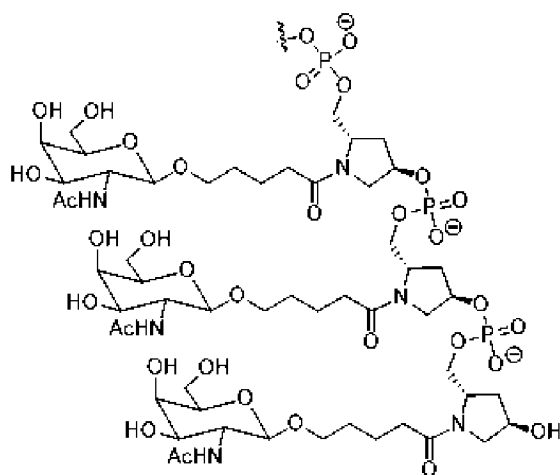
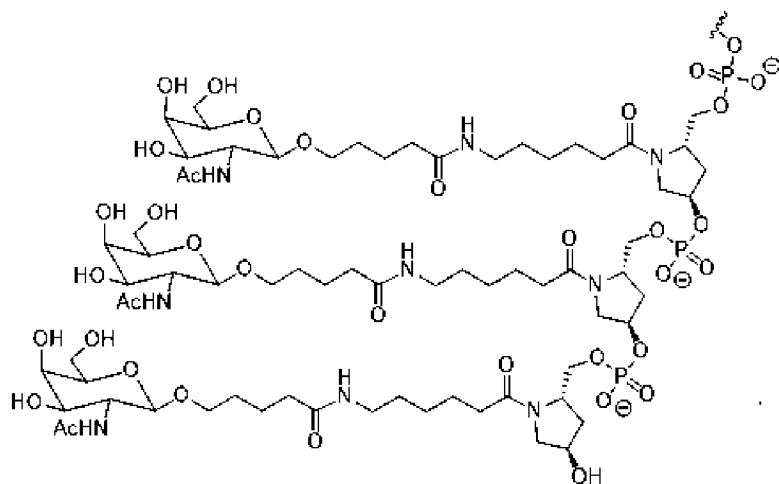


Формула XXVI;



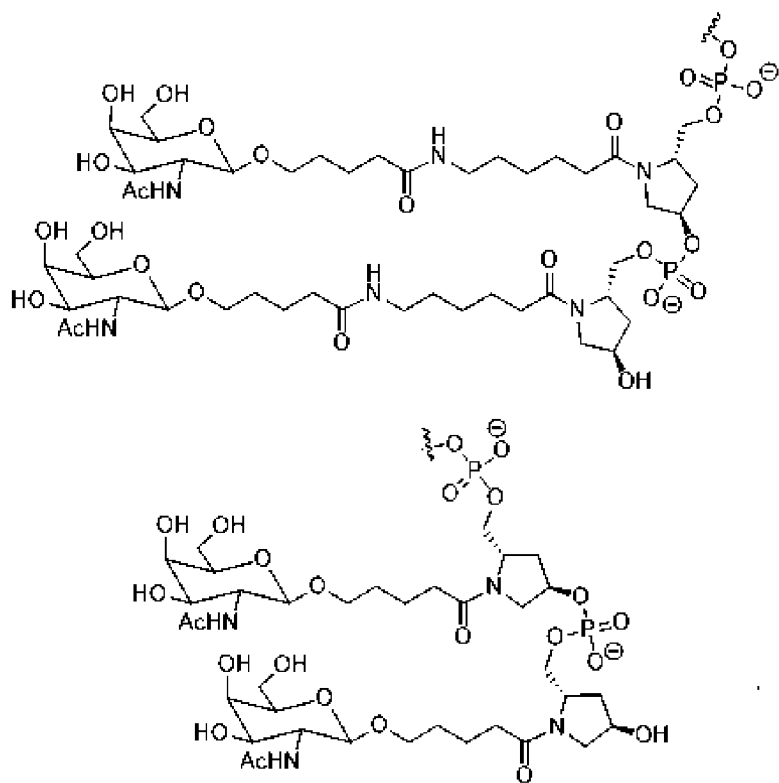
, где X представляет собой O или S

(Формула XXVII);



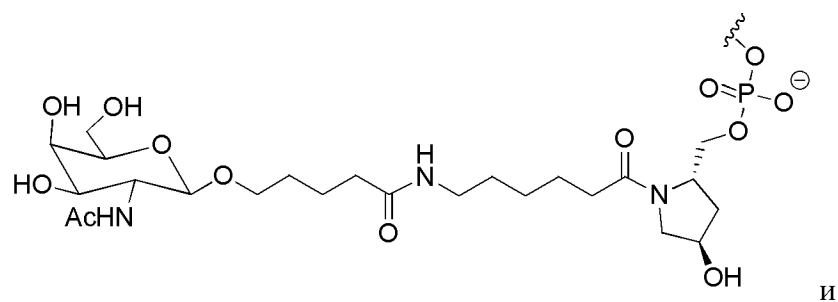
Формула XXVII; Формула

XXIX;

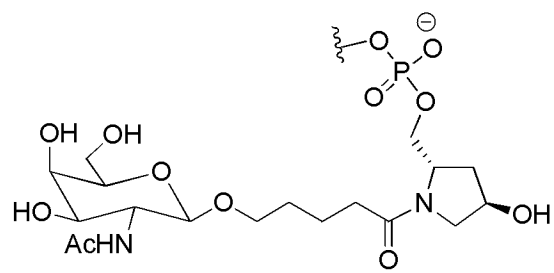


Формула XXX;

Формула XXXI;

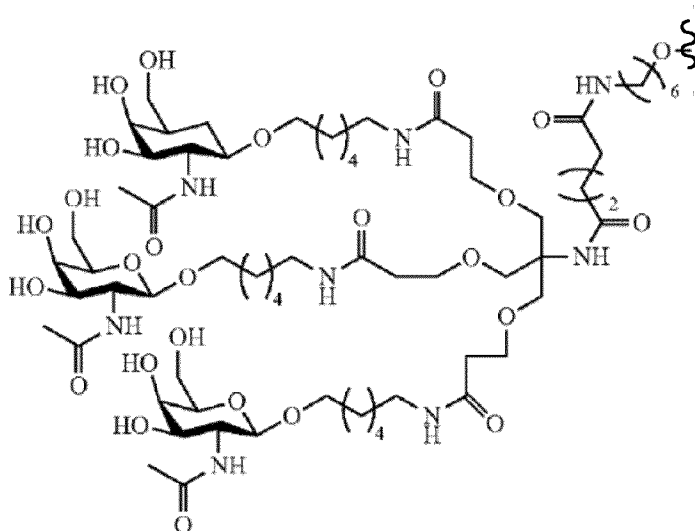


и



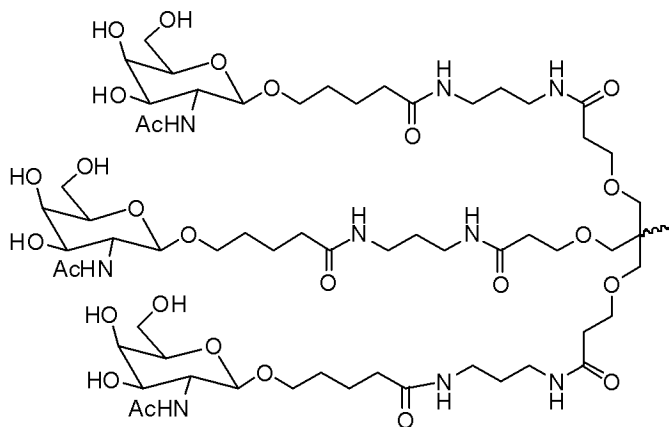
Формула XXXII;

Формула XXXIII.



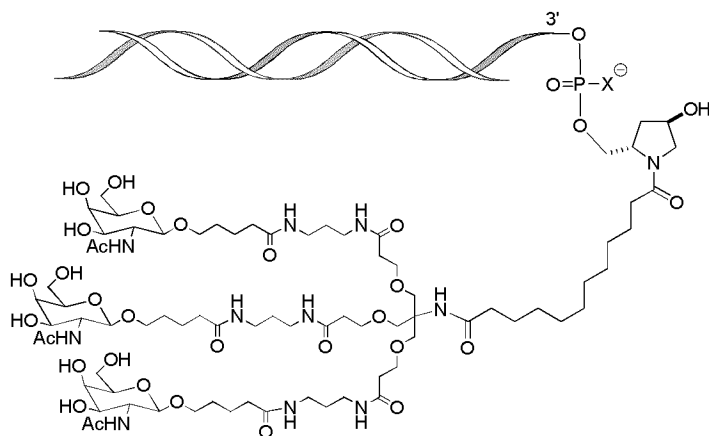
Формула XXXIV.

Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой моносахарид. Согласно определенным вариантам реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как

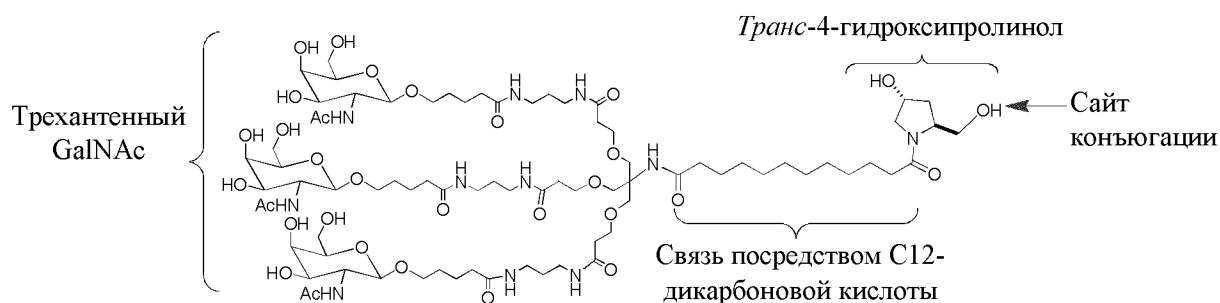


Формула II.

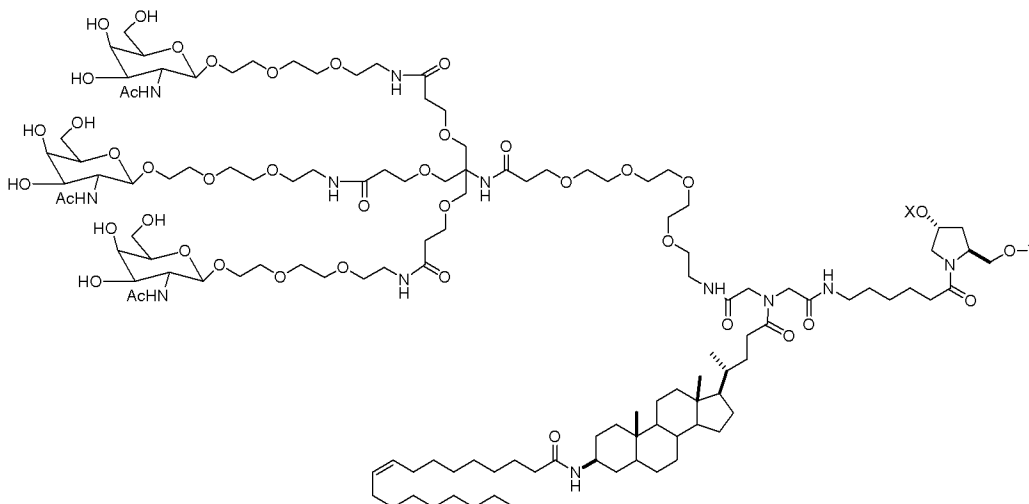
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи присоединен к углеводному конъюгату посредством линкера, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи конъюгирован с L96, как определено в Таблице 1 и показано ниже:



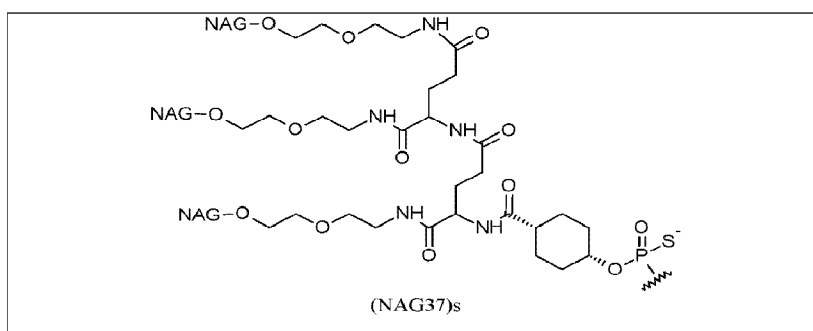
Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим,



(Формула XXXVI),

если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

Согласно некоторым вариантам реализации подходящий лиганд представляет собой лиганд, раскрытый в WO 2019/055633, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту реализации лиганд содержит структуру, представленную ниже:



Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут включать лиганды GalNAc, даже если в настоящее время предполагается, что такие лиганды GalNAc имеют ограниченное значение для предпочтительного интратекального/ЦНС пути(ей) доставки согласно настоящему изобретению.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат один или более GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к агенту иРНК. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду посредством линкера на смысловой цепи или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи, 5'-концу антисмысловой цепи или 3'-концу антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации GalNAc присоединен к 3'-концу смысловой цепи, например, посредством трехвалентного линкера.

Согласно другим вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНКи посредством множества линкеров, например, одновалентных линкеров.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента РНКи согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, но не ограничиваясь этим, модулятор ФК или пептид для проникновения в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают те, которые описаны в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

D. Линкеры

Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «связывающая группа» означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно соединяет две части

соединения. Линкеры, как правило, содержат непосредственную связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один или более метиленов могут быть прерваны или оканчиваются O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. Согласно определенным вариантам реализации линкер представляет собой примерно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Расщепляемая связывающая группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной за пределами клетки, но которая при попадании в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживал вместе. Согласно предпочтительному варианту реализации расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере примерно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере примерно в 100 раз быстрее в целевой клетке или в первом референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или во втором референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые связывающие группы восприимчивы к расщепляющим агентам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Обычно расщепляющие агенты более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или более активны внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая например, окисляющие или

восстанавливающие ферменты или восстанавливающие агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, те, которые приводят к рН, составляющему пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой связывающую группу, действуя в качестве общей кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными); и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к рН. рН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как средний внутриклеточный рН немного ниже в диапазоне от примерно 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислый рН в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый рН примерно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, что высвобождает катионный липид из лиганда внутри клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую связывающую группу, которая может расщепляться конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая будет мишенью. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом посредством линкера, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легкого, кору почек и яички.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В целом, пригодность кандидатной расщепляемой связывающей группы можно оценить путем тестирования способности разрушающего агента (или условия) расщеплять кандидатную связывающую группу. Также будет желательным тестирование кандидатной расщепляемой связывающей группы на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое условие выбрано, как указывающее на расщепление в целевой клетке, а второе условие выбрано, как указывающее на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в органной или тканевой культуре или у целых животных. Может быть полезным проводить первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтверждать путем дальнейших оценок у целых животных. Согласно предпочтительным вариантам реализации пригодные кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 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).

i. Расщепляемые в окислительно-восстановительных условиях связывающие группы

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемая связывающая группа представляет собой расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатная расщепляемая связывающая группа подходящей «расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группой» или, например, подходит ли она для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно обратить внимание на способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим агентом с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая будет наблюдаться в клетке, например, целевой клетке. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки. В одном варианте кандидатные соединения расщепляются в крови не более чем примерно на 10%. Согласно другим вариантам реализации пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примеры связывающих групп на основе фосфата представляют собой -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 реализации 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 реализации представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Указанные кандидаты можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

iii. Расщепляемые кислотой связывающие группы

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой связывающую группу. Расщепляемая кислотой связывающая группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в кислотных условиях. Согласно предпочтительным вариантам реализации расщепляемые кислотой связывающие группы расщепляются в кислой среде с рН примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые могут действовать в качестве общей кислоты. В клетке специфические органеллы с низким рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду расщепления для расщепляемых кислотой связывающих групп. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваются перечисленными, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)-$. В предпочтительном варианте реализации углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

iv. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира

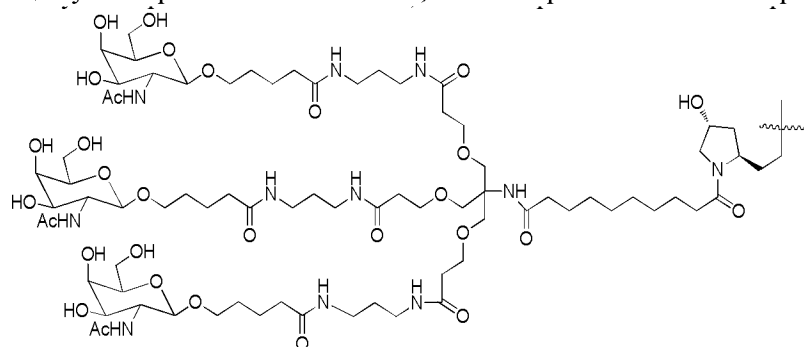
Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваются перечисленными, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

v. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида

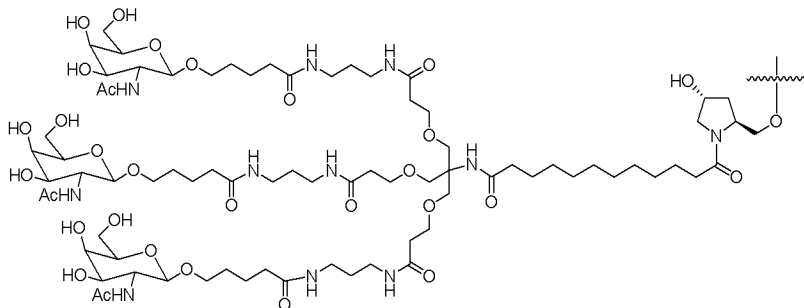
Согласно еще одному варианту реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида 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, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает полную амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида имеют общую формулу -

$\text{NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-}$, где RA и RB представляют собой группы R двух смежных аминокислот. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

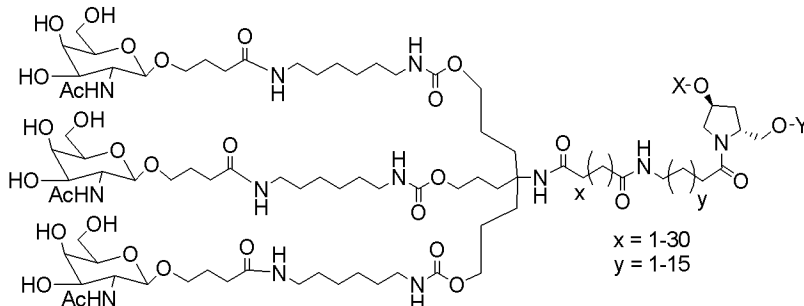
Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры конъюгатов иРНК-углевод с линкерами композиций и способов согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными,



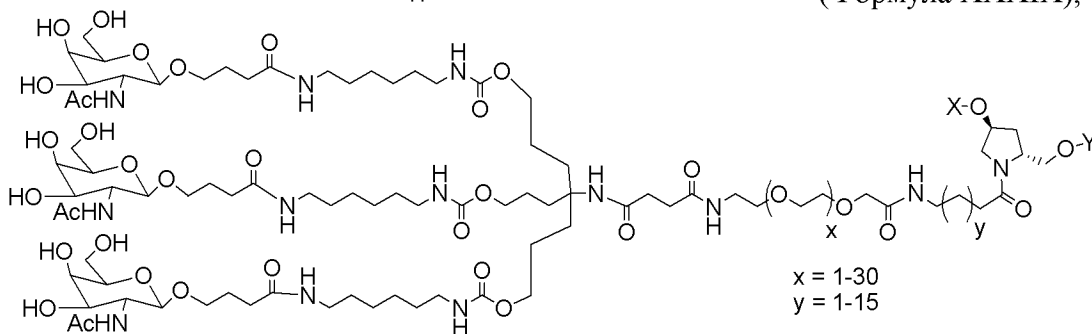
(Формула XXXVII),



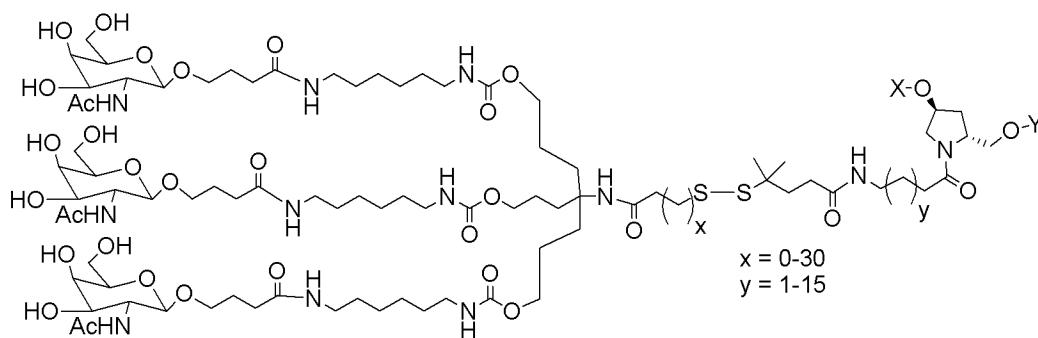
(Формула XXXVIII),



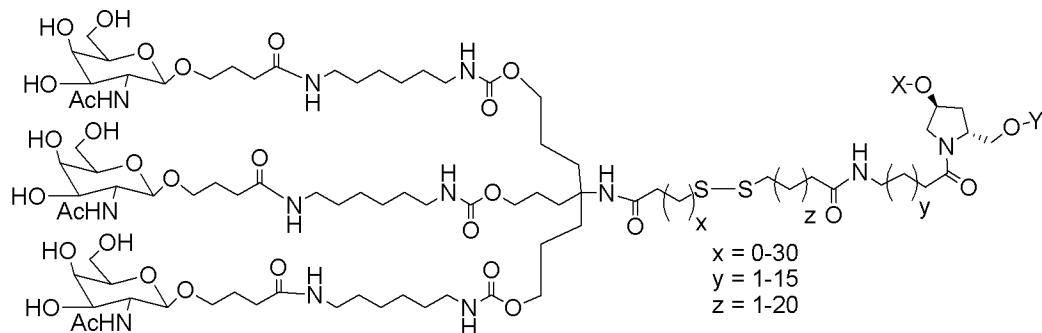
(Формула XXXIX),



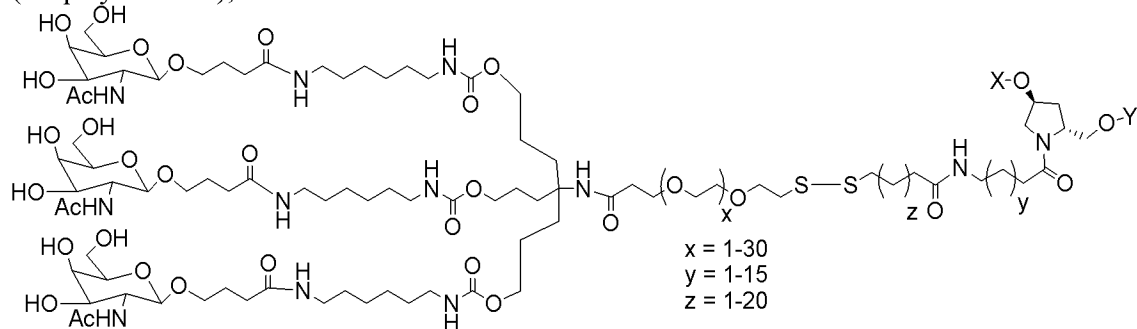
(Формула XL),



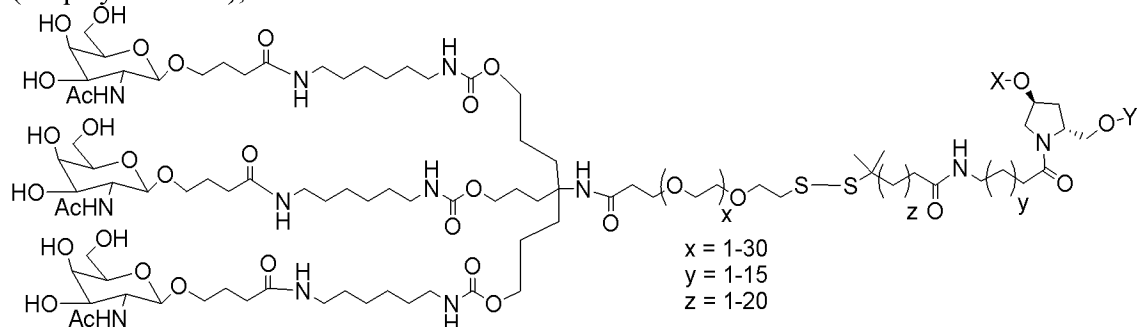
(Формула XLI),



(Формула XLII),



(Формула XLIII), и

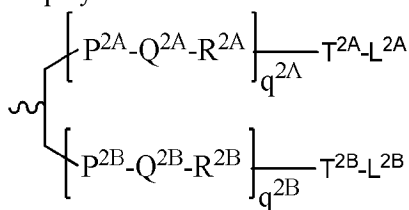


(Формула XLIV), если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

Согласно определенным вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или более производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

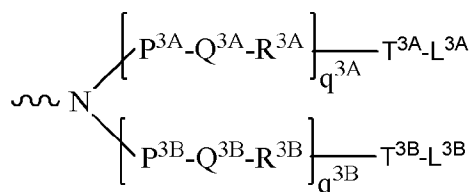
Согласно определенным вариантам реализации дцРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

Формула XXXXV

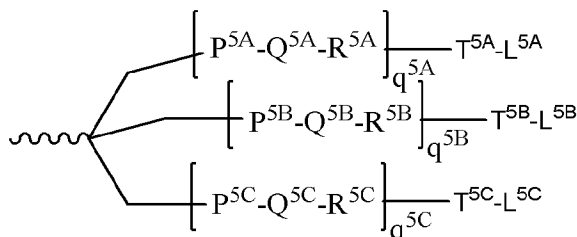
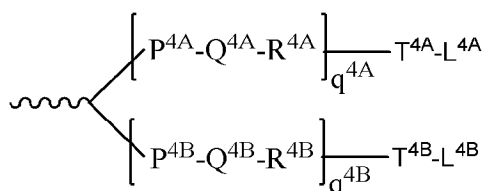


(IV)

Формула XLVI



(V)



, или

Формула XLVII

Формула XLVIII

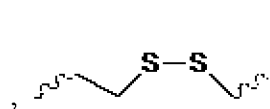
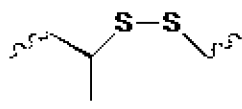
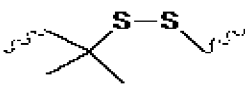
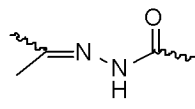
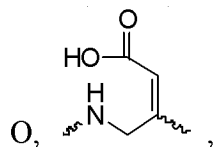
где:

$\text{q}^{2\text{A}}$, $\text{q}^{2\text{B}}$, $\text{q}^{3\text{A}}$, $\text{q}^{3\text{B}}$, $\text{q}^{4\text{A}}$, $\text{q}^{4\text{B}}$, $\text{q}^{5\text{A}}$, $\text{q}^{5\text{B}}$ и $\text{q}^{5\text{C}}$ представляют собой независимо для каждого случая 0-20, и где повторяющееся звено может быть одинаковым или отличающимся;

$\text{P}^{2\text{A}}$, $\text{P}^{2\text{B}}$, $\text{P}^{3\text{A}}$, $\text{P}^{3\text{B}}$, $\text{P}^{4\text{A}}$, $\text{P}^{4\text{B}}$, $\text{P}^{5\text{A}}$, $\text{P}^{5\text{B}}$, $\text{P}^{5\text{C}}$, $\text{T}^{2\text{A}}$, $\text{T}^{2\text{B}}$, $\text{T}^{3\text{A}}$, $\text{T}^{3\text{B}}$, $\text{T}^{4\text{A}}$, $\text{T}^{4\text{B}}$, $\text{T}^{5\text{A}}$, $\text{T}^{5\text{B}}$, $\text{T}^{5\text{C}}$ каждый независимо для каждого случая отсутствует, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

$\text{Q}^{2\text{A}}$, $\text{Q}^{2\text{B}}$, $\text{Q}^{3\text{A}}$, $\text{Q}^{3\text{B}}$, $\text{Q}^{4\text{A}}$, $\text{Q}^{4\text{B}}$, $\text{Q}^{5\text{A}}$, $\text{Q}^{5\text{B}}$, $\text{Q}^{5\text{C}}$ независимо для каждого случая отсутствуют, алкилен, замещенный алкилен, в котором один или более метиленов могут быть прерваны или терминированы одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

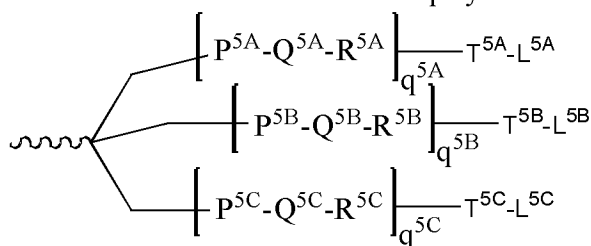
$\text{R}^{2\text{A}}$, $\text{R}^{2\text{B}}$, $\text{R}^{3\text{A}}$, $\text{R}^{3\text{B}}$, $\text{R}^{4\text{A}}$, $\text{R}^{4\text{B}}$, $\text{R}^{5\text{A}}$, $\text{R}^{5\text{B}}$, $\text{R}^{5\text{C}}$ каждый независимо для каждого случая отсутствует, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-



или гетероцикл;

$\text{L}^{2\text{A}}$, $\text{L}^{2\text{B}}$, $\text{L}^{3\text{A}}$, $\text{L}^{3\text{B}}$, $\text{L}^{4\text{A}}$, $\text{L}^{4\text{B}}$, $\text{L}^{5\text{A}}$, $\text{L}^{5\text{B}}$ и $\text{L}^{5\text{C}}$ представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно полезны для применения с агентами РНКи для ингибирования экспрессии целевого гена, например, те, которые имеют формулу (XLIX):

Формула XLIX



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но не ограничиваются перечисленными, структуры, приведенные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Типичные патенты США, в которых раскрыты конъюгаты РНК, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241 5391723; 5416203 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; и 8106022, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Не требуется, чтобы все положения в конкретном соединении были одинаково модифицированы, и в сущности более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, предпочтительно агенты на основе дцРНК, которые содержат две или более химически отличающихся областей, каждая из которых состоит из по меньшей мере одного мономерного звена, т. е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Указанные иРНК, как правило, содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицирована так, чтобы придать иРНК повышенную устойчивость к деградации нуклеазой, повышенное клеточное поглощение или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительная область иРНК может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы Н представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы Н приводит к расщеплению целевой РНК, значительно повышая тем самым эффективность ингибирования иРНК экспрессии генов. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими иРНК при использовании химерных дцРНК по сравнению с гибридизацией фосфотиоатных дезокси-дцРНК с той же целевой областью.

Расщепление целевой РНК можно рутинно детектировать с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, связанных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

В определенных случаях РНК в случае иРНК может быть модифицирована группой, отличной от лиганда. Ряд молекул, отличных от лигандов, конъюгировали с иРНК с целью повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, и процедуры для выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, отличные от лигандов, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиозфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловый или ундецильный остаток (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-O-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилноксистерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Типичные патенты Соединенных Штатов Америки, в которых раскрыто получение таких конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих аминоклипер в одном или более положениях последовательности. Затем проводят реакцию аминоклипер с конъюгируемой молекулой с использованием соответствующих реагентов для связывания или активации. Реакцию конъюгации можно выполнять либо с РНК, которая все еще связана с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

V. Доставка агента РНК согласно настоящему изобретению

Доставка агента РНК согласно настоящему изобретению в клетку, например, в клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, нуждающийся в этом субъект, такой как субъект, имеющий связанное с НТТ расстройство, например, болезнь Хантингтона, может быть достигнута несколькими различными способами. Например, доставку можно выполнять путем приведения клетки в контакт с агентом РНК согласно настоящему изобретению как *in vitro*, так и *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно выполнять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей агент РНК, например, дцРНК. В качестве альтернативы, доставку *in vivo* можно выполнять опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и управляют

экспрессией агента РНКи. Эти альтернативы более подробно обсуждаются ниже.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для применения с агентом РНКи согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Для доставки *in vivo* факторы, которые необходимо учитывать для доставки агента РНКи, включают, например, биологическую стабильность доставляемого агента, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемого агента в целевой ткани. Неспецифические эффекты агента РНКи можно свести к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань или путем местного введения препарата. Локальное введение в участок обработки обеспечивает максимальную локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены агентом или которые могут разрушить агент, и позволяет вводить более низкую общую дозу агента РНКи. Несколько исследований показали успешный нокдаун генных продуктов при локальном введении агента РНКи. Например, было показано, что как внутриглазная доставка дцРНК VEGF путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ. *et al.*, (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретиальные инъекции мышам (Reich, SJ. *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предотвращают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция дцРНК у мышей приводит к уменьшению объема опухоли (Pille, J. *et al.* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать выживаемость несущих опухоль мышей (Kim, WJ. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. *et al.*, (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Также было показано, что РНК-интерференция является успешной при локальной доставке в ЦНС с помощью прямой инъекции (Dorn, G. *et al.*, (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH. *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H. *et al.* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al.* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al.* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие с помощью интраназального введения (Howard, KA. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. *et al.*, (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). В случае системного введения агента РНКи для лечения заболевания РНК можно модифицировать или альтернативно доставлять с помощью системы доставки лекарственных средств; при этом оба способа обеспечивают предотвращение быстрой деградации дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать нацеливание агента РНКи на целевую ткань и позволяют избежать нежелательных нецелевых эффектов (например, не желая быть связанным теорией, было установлено, что применение GNA, описанных в настоящем документе, дестабилизирует затравочную область дцРНК, что приводит к большему предпочтению таких дцРНК в отношении целевой эффективности, относительно нецелевых эффектов, так как такие нецелевые эффекты значительно ослаблены дестабилизацией такой затравочной области).

Агенты РНКи можно модифицировать путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения клеточного поглощения и предотвращения деградации. Например, агент РНКи, направленный против АроВ, конъюгированный с липофильным фрагментом холестерина, был инъецирован системно мышам и привел к нокдауну мРНК аroВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J. *et al.*, (2004) *Nature* 432:173-178). Было показано, что конъюгация агента РНКи с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в модели рака предстательной железы на мышах (McNamara, JO. *et al.*, (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Согласно альтернативному варианту реализации агент РНКи может быть доставлен с применением систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы агента РНКи (отрицательно заряженного), а также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, чтобы обеспечить эффективное поглощение агента РНКи клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны с агентом РНКи, либо индуцированы с образованием везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH. *et al.*, (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), в которой заключен агент РНКи. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию агента РНКи при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионное соединение-агент РНКи находятся в пределах возможностей специалиста в данной области техники (см., например, Sorensen, DR., *et al.* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN. *et al.*, (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al.* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодные для системной доставки агентов РНКи, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al.* (2003), выше; Verma, UN. *et al.*, (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann, TS. *et al.*, (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY. *et al.*, (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. *et al.*, (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. *et al.*, (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA. *et al.*, (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. *et al.*, (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции агентов РНКи и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу снижения экспрессии целевого гена НТТ в клетке, включающему приведение указанной клетки в контакт с двухцепочечным агентом РНКи согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации клетка представляет собой внепеченочную клетку, необязательно клетку ЦНС.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии целевого гена НТТ у субъекта, включающему введение указанному субъекту двухцепочечного агента РНКи согласно настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, имеющего расстройство ЦНС, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного нацеливающего на НТТ агента РНКи согласно настоящему изобретению, что обеспечивает лечение указанного субъекта. Примерные расстройства ЦНС, которые можно лечить с помощью способа согласно настоящему изобретению, включают болезнь Хантингтона.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНКи вводят интратекально. С помощью интратекального введения двухцепочечного агента РНКи способ может обеспечить снижение экспрессии целевого гена НТТ в ткани головного мозга (например, стриатуме) или позвоночника, например, в коре, мозжечке, шейном отделе позвоночника, поясничном отделе позвоночника и грудном отделе позвоночника.

Для удобства изложения составы, композиции и способы в этом разделе обсуждаются в основном в отношении модифицированных соединений киРНК. Однако можно понять, что эти составы, композиции и способы можно применять на практике с другими соединениями киРНК, например, немодифицированными соединениями киРНК, и такое практическое применение находится в пределах настоящего изобретения. Композиция, которая включает агент РНКи, может быть доставлена субъекту с помощью ряда путей. Примерные пути включают: интратекальный, внутривенный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, назальный, легочной и глазной.

Агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, включают одно или более соединений агента РНКи и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и тому подобное, которые являются совместимыми с введением фармацевтического средства. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. В композиции также могут быть включены вспомогательные активные соединения.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (включая офтальмологическое, вагинальное, ректальное, интраназальное, трансдермальное), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное вливание, подкожную, внутривенную или внутримышечную

инъекцию или интратекальное или интравентрикулярное введение.

Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания. Например, для нацеливания на мышечные клетки внутримышечная инъекция в представляющие интерес мышцы будет логическим выбором. Нацеливание на клетки легких можно осуществлять путем введения агента РНКи в форме аэрозоля. Нацеливание на сосудистые эндотелиальные клетки можно осуществлять путем нанесения агента РНКи в виде покрытия на баллонный катетер и механического введения РНК.

Составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут потребоваться или могут быть желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п. Также можно применять презервативы с покрытием, перчатки и т. п.

Композиции для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде, сиропы, эликсиры или неводные среды, таблетки, капсулы, таблетки для рассасывания или пастилки. В случае таблеток носители, которые можно применять, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках обычно используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсулы подходящие разбавители представляют собой лактозу и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Если для перорального применения требуются водные суспензии, композиции нуклеиновой кислоты можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости можно добавлять определенные подсластители или вкусоароматические агенты.

Композиции для интратекального или интравентрикулярного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки.

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Интравентрикулярную инъекцию можно облегчить с помощью интравентрикулярного катетера, например, присоединенного к резервуару. Для внутривенного применения общую концентрацию растворенных веществ можно контролировать, чтобы сделать препарат изотоническим.

Согласно одному варианту реализации введение композиции соединения киРНК, например, двухцепочечного соединения киРНК или соединения оциРНК, является парентеральным, например, внутривенным (например, в виде болюса или диффузионной инфузии), внутрикожным, внутривентрикулярным, внутримышечным, интратекальным, интравентрикулярным, внутричерепным, подкожным, через слизистую, буккальным, подъязычным, эндоскопическим, ректальным, пероральным, вагинальным, местным, легочным, интраназальным, уретральным или глазным. Введение может обеспечиваться субъектом или другим лицом, например, поставщиком медицинских услуг. Лекарственное

средство может быть обеспечено в отмеренных дозах или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные способы доставки более подробно обсуждаются ниже.

А. Интратекальное введение.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНКи доставляют путем интратекальной инъекции (т. е. инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Интратекальную инъекцию агентов РНКи в спинномозговую жидкость можно выполнять в виде болюсной инъекции или посредством мининасосов, которые можно имплантировать под кожу, обеспечивая регулярную и постоянную доставку кРНК в спинномозговую жидкость. Циркуляция спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения, где она продуцируется, происходит вниз вокруг спинного мозга и ганглиев дорсальных корешков, а затем вверх вокруг мозжечка и вокруг коры до арахноидальных грануляций, где жидкость может выходить из ЦНС, таким образом, в зависимости от размера, стабильности и растворимости инъецируемых соединений молекулы, доставленные интратекально, могут поражать мишени по всей ЦНС.

Согласно некоторым вариантам реализации интратекальное введение осуществляют посредством насоса. Насос может представлять собой хирургически имплантируемый осмотический насос. Согласно одному варианту реализации осмотический насос имплантируют в субарахноидальное пространство спинномозгового канала для облегчения интратекального введения.

Согласно некоторым вариантам реализации интратекальное введение осуществляют посредством системы интратекальной доставки для фармацевтического средства, включающей резервуар, содержащий некоторый объем фармацевтического агента, и насос, спроектированный для доставки части фармацевтического агента, содержащейся в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе интратекальной доставки можно найти в WO 2015/116658, который полностью включен посредством ссылки.

Количество интратекально инъецируемых агентов РНКи может варьироваться для разных целевых генов, и подходящее количество, которое необходимо внести, может быть определено индивидуально для каждого целевого гена. Как правило, это количество находится в диапазоне от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

В. Кодированные векторы агенты РНКи согласно настоящему изобретению

Агенты РНКи, нацеленные на ген НТТ, могут быть экспрессированы из единиц транскрипции, вставленных в векторы ДНК или РНК (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG*. (1996), 12:5-10; WO 00/22113, WO 00/22114 и US 6054299). Экспрессия предпочтительно является устойчивой (месяцы или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа целевой ткани или клетки. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующийся или неинтегрирующийся вектор. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы обеспечить его наследование в качестве внехромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1292).

Отдельную цепь или цепи агента РНКи можно транскрибировать с промотора на векторе экспрессии. Если две отдельные цепи должны экспрессироваться для создания, например, дцРНК, два отдельных вектора экспрессии могут быть введены совместно (например, посредством трансфекции или инфекции) в целевую клетку. В качестве альтернативы, каждая отдельная цепь дцРНК может быть транскрибирована промоторами, оба из которых расположены на одной и той же экспрессионной плазмиде. Согласно одному варианту реализации дцРНК экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных с помощью линкерной полинуклеотидной последовательности так, что дцРНК имеет структуру стебля и петли.

Векторы экспрессии агента РНКи обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно применять для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии агента РНКи, описанного в настоящем документе. Доставка векторов, экспрессирующих агент РНКи, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, высаженные из организма пациента, с последующим повторным введением в организм пациента, или любыми другими способами, которые обеспечивают введение в желаемую целевую клетку.

Вирусные векторные системы, которые можно применять со способами и композициями, описанными в настоящем документе, включают: но не ограничиваются перечисленными, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони, и *т.д.*; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвирусов, такие как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или оспы птиц, например, оспы канареек или оспы птиц; и (j) хелпер-зависимый или «выпотрошенный» аденовирус. Дефектные по репликации вирусы также могут быть предпочтительными. Различные векторы будут включены в геном клеток, но не обязательно. При необходимости конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. Конструкции для рекомбинантной экспрессии агента РНКи обычно будут требовать регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и *т. д.*, для обеспечения экспрессии агента РНКи в целевых клетках. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области техники.

VI. Композиции согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает композиции, включая фармацевтические композиции и составы, которые включают агенты РНКи согласно настоящему изобретению.

Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены композиции, содержащие два или более, например, 2, 3, или 4, агентов на основе дцРНК, таких как первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ, например, агенты на основе дцРНК, содержащие смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем каждая из смысловых цепей или каждая из антисмысловых цепей представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, независимо выбранную из группы, состоящей из любой из смысловых цепей и антисмысловых цепей в любой из Таблиц 2-5.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи, или композицию, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи или композицию, можно применять для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией или активностью НТТ, например, болезни Хантингтона.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению являются стерильными. Согласно другому варианту реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению не содержат пирогенов или являются апирогенными.

Такие фармацевтические композиции изготавливают, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые изготовлены для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем внутривенной (IV), внутримышечной (IM) или подкожной (subQ) доставки. Другим примером являются композиции, которые изготовлены для прямой доставки в ЦНС, например, путем интратекальной или интравитреальной инъекции, необязательно путем инфузии в головной мозг (например, стриатум), например, посредством непрерывной инфузии с помощью насоса.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозировках, достаточных для ингибирования экспрессии гена НТТ. В целом, подходящая доза агента РНКи согласно настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в сутки, как правило, в диапазоне от примерно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки.

Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества агента РНКи на регулярной основе, например, ежемесячно или один раз в шесть месяцев. Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи вводят от примерно одного раза в квартал (т. е. примерно один раз в три месяца) до примерно двух раз в год.

После начального режима лечения (например, нагрузочной дозы) средства лечения можно вводить на менее частой основе.

Согласно другим вариантам реализации однократная доза фармацевтических композиций может обладать длительным действием так, что последующие дозы вводят с

интервалами не более 1, 2, 3 или 4 или более месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в месяц. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят от одного раза в квартал до двух раз в год.

Специалист в данной области техники поймет, что на дозировку и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, могут влиять определенные факторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, тяжесть заболевания или расстройства, предыдущие средства лечения, общее состояние здоровья или возраст субъекта, а также другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократную обработку или ряд обработок.

Достижения в генетике мышей привели к созданию ряда моделей на мышах для исследования различных заболеваний человека, таких как HD, при которых будет получена польза от снижения экспрессии HTT. Такие модели можно применять для *in vivo* тестирования агентов РНКи, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие модели на грызунах известны в данной области техники и включают, например, те, которые описаны в Cepeda, *et al.* (*ASN Neuro* (2010) 2(2):e00033) и Pouladi, *et al.* (*Nat Reviews* (2013) 14:708).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное введение, например, посредством имплантированного устройства; или внутричерепное, например, путем интрапаренхимального, интратекального или интравентрикулярного введения.

Агенты РНКи могут быть доставлены таким образом, чтобы нацеливаться на конкретную ткань, такую как ЦНС (например, нейрональную, глиальную или сосудистую ткань головного мозга).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут потребоваться или могут быть желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п. Также можно применять презервативы с покрытием, перчатки и т. п. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, смешаны с агентом для местной доставки,

таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие агенты и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидил DOPE этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтанолламин DOTMA). Агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности, катионные липосомы. В качестве альтернативы, агенты РНКи могут быть объединены в комплекс с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, но не ограничиваются перечисленными, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C1-20 алкиловый сложный эфир (например, изопропилмиристенат IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в US 6747014, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Составы агентов РНКи, содержащие мембранные молекулярные агрегаты

Агент РНКи для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть изготовлен для доставки в мембранном молекулярном агрегате, например, в липосоме или мицелле. В настоящем документе термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, сгруппированных по меньшей мере в один бислой, например, в один бислой или во множество бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию агента РНКи. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию агента РНКи, хотя в некоторых примерах она может. Липосомы можно применять для переноса и доставки активных ингредиентов в место действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно сходна с биологическими мембранами, при внесении липосом в ткань липосомальный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере прогрессирования слияния липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает агент РНКи, доставляется в клетку, где агент РНКи может специфично связываться с целевой РНК и может опосредовать РНКи. В некоторых случаях липосомы также специфично нацелены, например, для направления агента РНКи на конкретные типы клеток.

Липосому, содержащую агент РНКи, можно получить с помощью ряда способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяется в детергенте таким образом,

что мицеллы образуются с липидным компонентом. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования и может быть неионогенным. Примерные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат агента РНКи добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют с агентом РНКи и конденсируются вокруг агента РНКи с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, с помощью диализа, с получением липосомального препарата агента РНКи.

При необходимости во время реакции конденсации может быть добавлено соединение-носитель, которое способствует конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). pH также может быть скорректирован для облегчения конденсации.

Способы получения стабильных носителей для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов носителя для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Образование липосомы также может включать один или более аспектов примерных способов, описанных в Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham *et al.*, (1965) *M. Mol. Biol.* 23:238; Olson *et al.*, (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557:9; Szoka *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194; Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169; Kim *et al.*, (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 728:339; и Fukunaga *et al.*, (1984) *Endocrinol.* 115:757. Обычно используемые методики для получения липидных агрегатов подходящего размера для применения в качестве носителей для доставки включают ультразвуковое воздействие и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer *et al.*, (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858:161). Микрофлюидизацию можно применять, если желательны стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169. Эти способы легко адаптируют для упаковки препаратов агента РНКи в липосомы.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс нуклеиновая кислота/липосома связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализуется в эндосому. Из-за кислого pH в эндосоме липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют комплекс с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид одинаково заряжены, происходит

отталкивание, а не образование комплекса. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается в водной внутренней части этих липосом. рН-чувствительные липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. В целевых клетках детектировалась экспрессия экзогенного гена (Zhou *et al.* (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина, полученного из природных источников. Нейтральные липосомные композиции, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции обычно образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные способные к слиянию липосомы образованы главным образом из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образуется из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC сои и PC яиц. Другой тип образуется из смесей фосфолипида или фосфатидилхолина, или холестерина.

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

Также исследовали неионогенные липосомальные системы для определения их применимости при доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Для доставки в дерму кожи мыши циклоспорина-А использовали неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир). Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы эффективно облегчали отложение циклоспорина А в различные слои кожи (Hu *et al.*, (1994) *S.T.P. Pharma. Sci.*, 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин который в контексте настоящего документа относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, не содержащими таких специализированных липидов. Примеры стерически стабилизированных липосом представляют собой те, в которых часть образующей везикулу липидной части липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносialogанглиозид G_{M1}, или (В) дериватизирована одним или более гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, в данной области техники полагают, что по меньшей мере для стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-дериватизированные липиды,

увеличенный период полужизни в кровотоке этих стерически стабилизированных липосом обусловлен сниженным поглощением в клетки ретикулоэндотелиальной системы (Allen *et al.*, (1987) *FEBS Letters*, 223:42; Wu *et al.*, (1993) *Cancer Research*, 53:3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, известны в данной области техники. Papahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1987), 507:64) сообщили о способности моносиалоганглиозида G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола улучшать период полужизни липосом в крови. Эти результаты были объяснены Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1988), 85:6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба за авторством Allen *et al.*, раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сульфатный сложный эфир галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb *et al.*) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim *et al.*).

Согласно одному варианту реализации используют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в возможности слияния с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя они и не способны так эффективно сливаться с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и могут быть применены для доставки агентов РНКи в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают следующие: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать широкий спектр водорастворимых и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные агенты РНКи в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, in «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важные соображения при получении липосомных составов включают заряд липидной поверхности, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) можно применять для образования небольших липосом, которые спонтанно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран культуры клеток ткани, что приводит к доставке агента РНКи (см., например, Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417, и патент США № 4897355, где описан DOTMA и его применение с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием ДНК-комплексирующих везикул. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективный агент для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры ткани, который содержит положительно заряженные липосомы DOTMA, которые спонтанно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с

образованием комплексов. При использовании достаточно положительно заряженных липосом общий заряд в полученных комплексах также является положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким образом, спонтанно прикрепляются к отрицательно заряженным поверхностям клеток, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры ткани. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что фрагменты олеоила связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие описанные катионные липидные соединения включают те, которые были конъюгированы с различными фрагментами, включая, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения как 5-карбоксиспермилглицин диоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-5-карбоксиспермиламид («DPPEs») (см., например, патент США № 5171678).

Другой катионный липидный конъюгат включает дериватизацию липида холестеринном («DC-Chol»), который был включен в состав липосом в комбинации с DOPE (см. Gao, X. and Huang, L., (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280). Сообщалось, что липополилизин, полученный путем конъюгирования полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8). Для определенных клеточных линий эти липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, как полагают, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем композиции, содержащие DOTMA. Другие коммерчески доступные катионные липидные продукты включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Холья, Калифорния) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомальные составы особенно подходят для местного введения, липосомы обладают несколькими преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные эффекты, связанные с высоким системным всасыванием вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в желаемой мишени и возможность введения агента РНКи в кожу. Согласно некоторым вариантам реализации липосомы применяют для доставки агента РНКи в эпидермальные клетки, а также для усиления проникновения агента РНКи в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно наносить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, изготовленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner *et al.*, (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2, 405-410 и du Plessis *et al.*, (1992) *Antiviral Research*, 18:259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) *Biotechniques* 6:682-690; Itani, T. *et al.*, (1987) *Gene* 56:267-276; Nicolau, C. *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 149:157-176; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) *Meth. Enzymol.*

101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855).

Также исследовали неионогенные липосомальные системы для определения их применимости при доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мыши. Такие составы с агентом РНКи можно применять для лечения дерматологического расстройства.

Липосомы, которые включают агенты РНКи, могут быть получены с высокой степенью деформируемости. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через поры, которые меньше среднего радиуса липосомы. Например, трансферосомы представляют собой тип деформируемых липосом. Трансферосомы можно получать путем добавления активаторов кромок поверхности, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомальную композицию. Трансферосомы, которые включают агент РНКи, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции с целью доставки агента РНКи в кератиноциты в коже. Чтобы пересечь интактную кожу млекопитающих, липидные везикулы должны проходить через ряд мелких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, из-за липидных свойств эти трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и часто могут достигать своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются.

Другие составы, пригодные согласно настоящему изобретению, описаны в предварительной заявке на патент США с серийным номером 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г. и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В РСТ заявке на патент № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, которые пригодны согласно настоящему изобретению.

Трансферосомы, еще один тип липосом, представляют собой высокодеформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в качестве носителей для доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капли, которые являются настолько деформируемыми, что они легко способны проникать через поры, которые меньше, чем капли. Трансферосомы адаптируются к среде, в которой они используются, например, они являются самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, часто достигают своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются. Для получения трансферосом можно добавлять активаторы кромок поверхности, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомальной композиции. Трансферосомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу.

Было показано, что опосредуемая трансферосомами доставка сывороточного альбумина является такой же эффективной, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, такие как те, которые описаны в настоящем документе, в частности, в эмульсиях (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенным способом классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как «голова») обеспечивает наиболее подходящие средства для классификации различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах и могут использоваться в широком диапазоне значений pH. В целом, их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до примерно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерина, сложные эфиры полиглицерина, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. В данный класс также включены неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее популярными членами класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при ее растворении или диспергировании в воде, поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламидами аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными членами класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

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

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести как

положительный, так и отрицательный заряд, 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 лекарственных продуктах, составах и эмульсиях (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Агент РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению также может быть обеспечен в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определены в настоящем документе как конкретный тип молекулярного агрегата, в котором амфипатические молекулы сгруппированы в сферической структуре таким образом, что все гидрофобные части молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Обратная группировка существует, если среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции кРНК, C₈-C₂₂-алкилсульфата щелочного металла и соединений, образующих мицеллы. Примерные соединения, образующие мицеллы, включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло примулы вечерней, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, полиоксиэтиленовые простые эфиры и их аналоги, полидоканолалкиловые простые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Образующие мицеллы соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться при по существу любом типе перемешивания ингредиентов, но для получения мицелл меньшего размера необходимо энергичное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию кРНК и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают с по меньшей мере тремя соединениями, образующими мицеллы, с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем перемешивания композиции кРНК, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из соединений, образующих мицеллы, с последующим добавлением оставшихся соединений, образующих мицеллы, с энергичным перемешиванием.

Фенол или м-крезол могут быть добавлены в смешанную мицеллярную композицию для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы, фенол или м-крезол могут быть добавлены вместе с ингредиентами, образующими мицеллы. Изотонический агент, такое как глицерин, также можно добавлять после образования

смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно помещать в аэрозольный дозатор, и дозатор заправляют пропеллентом. Пропеллент, находящийся под давлением, находится в жидкой форме в дозаторе. Соотношения ингредиентов регулируют таким образом, чтобы водная и пропеллентная фазы становились одной, т. е. существует одна фаза. Если есть две фазы, необходимо встряхнуть дозатор перед распределением части содержимого, например, через дозирующий клапан. Распределяемая доза фармацевтического агента выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного спрея.

Пропелленты могут включать хлорфторуглероды, водородосодержащие фторуглероды, простой диметилловый эфир и простой диэтиловый эфир. Согласно определенным вариантам реализации можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены посредством относительно простых экспериментов. Для всасывания через полость рта часто желательно увеличить, например, по меньшей мере в два или в три раза, дозировку для введения путем инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

В. Липидные частицы

Агенты РНКи, например, дцРНК согласно настоящему изобретению, могут быть полностью инкапсулированы в липидный состав, например, LNP или другую частицу нуклеиновой кислоты и липида.

В настоящем документе термин «LNP» относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты и липида. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, PEG-липидный конъюгат). LNP являются чрезвычайно подходящими для системного применения, поскольку они характеризуются увеличенной продолжительностью жизни в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, в участках, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующего агента и нуклеиновой кислоты, как изложено в WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению, как правило, имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, более типично от примерно 60 нм до примерно 130 нм, более типично от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее типично от примерно 70 нм до примерно 90 нм и являются по существу нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, присутствующие в частицах нуклеиновой кислоты и липида согласно настоящему изобретению, являются устойчивыми к деградации нуклеазой в водном растворе. Частицы нуклеиновой кислоты и липида и их способ получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации патента США № 2010/0324120 и WO 96/40964.

Согласно одному варианту реализации соотношение липид/лекарственное средство (соотношение масса/масса) (например, соотношение липид/дцРНК) будет находиться в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 50:1, от примерно 1:1 до примерно 25:1, от

примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 9:1 или от примерно 6:1 до примерно 9:1. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Определенные конкретные составы LNP для доставки агентов РНК и описаны в данной области техники, включая, например, составы LNP01, описанные в WO 2008/042973, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные примерные составы липид-дцРНК указаны в таблице ниже.

	Ионизируемый/катионный липид	катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:киРНК
SNALP-1	1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:киРНК ~7:1
2-ХТС	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:киРНК ~7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:киРНК ~6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:киРНК ~11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:киРНК ~6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:киРНК ~11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК 10:1

LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:киPHK: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:киPHK: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 Липид:киPHK: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киPHK: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

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

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

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристилоксипропиламин (PEG со средней мол. массой 2000)

Содержащие SNALP (1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)) составы описаны в WO 2009/127060, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие XTC составы описаны в WO 2010/088537, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие MC3 составы описаны, например, в публикации патента США № 2010/0324120, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие ALNY-100 составы описаны в WO 2010/054406, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие C12-200 составы, описаны в WO 2010/129709, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательными загустители, вкусоароматические агенты, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие агенты или связывающие агенты. Согласно некоторым вариантам реализации пероральные составы представляют собой составы, в которых дцРНК, охарактеризованные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или более улучшающими проникновение поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсodeзоксихенодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, таурodeзоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додeciлазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). Согласно некоторым вариантам реализации применяют комбинации усилителей проникновения, например,

жирных кислот/солей в комбинации с желчными кислотами/солями. Одна примерная комбинация представляет собой натриевую соль лауриновой кислоты, каприновую кислоту и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый простой эфир. ДцРНК, охарактеризованные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в гранулированной форме, включающей распыленные высушенные частицы, или в комплексе с образованием микрочастиц или наночастиц. Агенты, образующие комплекс с дцРНК, включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-дериватизированные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинотетраэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, p-амино), полиметилцианоакрилат, полиэтилцианоакрилат, полибутилцианоакрилат, полиизобутилцианоакрилат, полиизогексилцианоакрилат, DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли-D,L-молочную кислоту, поли-DL-молочную-со-гликолевую кислоту (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального применения дцРНК и их получение подробно описаны в патенте США 6887906, US 2003/0027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхимального (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но не ограничиваясь перечисленными, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Указанные композиции могут быть созданы из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, предварительно образованные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. При лечении связанных с НТТ заболеваний или расстройств особенно предпочтительными являются составы, которые нацелены на головной мозг.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, которые могут быть удобно представлены в единичной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с общепринятыми методиками, хорошо известными в фармацевтической отрасли. Такие методики включают этап ассоциации активных ингредиентов с фармацевтическим(и) носителем(ями) или вспомогательным(и) веществом(ами). В целом,

составы получают путем равномерного и тщательного соединения активных ингредиентов с жидким носителями или тонкодисперсными твердыми носителями или и тем, и другим, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть изготовлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

С. Дополнительные составы

Эмульсии

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и изготовлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 μm в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно смешанные и диспергированные друг с другом. В целом, эмульсии могут быть типа «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в). Если водная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капелек в объемной масляной фазе, полученная композиция называется эмульсией «вода-в-масле» (в/м). В качестве альтернативы, если масляная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капелек в объемной водной фазе, полученная композиция называется эмульсией «масло-в-воде» (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам, и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо в виде отдельной фазы само по себе. Фармацевтические вспомогательные вещества, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также при необходимости могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой несколько эмульсий, которые состоят более чем из двух фаз, такие как, например, эмульсии типа «масло-в-воде-в-масле» (м/в/м) и «вода-в-масле-в-воде» (в/м/в). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которых не

обеспечивают простые бинарные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капли эмульсии м/в заключают мелкие капли воды, представляют собой эмульсию в/м/в. Подобным образом, система масляных капель, заключенная в глобулы воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, обеспечивает эмульсию м/в/м.

Эмульсии характеризуются незначительной термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто диспергированная или прерывистая фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в этой форме посредством эмульгаторов или вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может представлять собой полутвердое вещество или твердое вещество, как в случае мазевых основ и кремов эмульсионного типа. Другие способы стабилизации эмульсий предусматривают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую из фаз эмульсии. Эмульгаторы можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбирующие основы и мелкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные агенты, нашли широкое применение при изготовлении эмульсий и рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества, как правило, являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильного и гидрофобного характера поверхностно-активного вещества называется гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом для классификации и отбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы в зависимости от характера гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные основы обладают гидрофильными свойствами так, что они могут всасывать воду с образованием эмульсий в/м, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию, такие как

безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Также в качестве хороших эмульгаторов применяются мелкодисперсные твердые вещества, в частности, в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. К ним относятся полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный алюмосиликат и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

Большой ряд неэмульгирующих материалов также включен в эмульсионные составы и вносит вклад в свойства эмульсий. К ним относятся жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, аравийская камедь, агар, альгиновая кислота, каррагинан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных межфазных пленок вокруг капель диспергированной фазы и увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, эти составы часто включают консерванты. Обычно используемые консерванты, включенные в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры *p*-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют в эмульсионные составы для предотвращения ухудшения характеристик состава. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой поглотители свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстанавливающие агенты, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и антиоксидантные синергические соединения, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их изготовления рассмотрены в литературе (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для

пероральной доставки широко используются из-за легкости изготовления, а также эффективности с точки зрения всасывания и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минерального масла, маслорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира входят в число материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий м/в.

ii. Микроэмульсии

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции агентов РНКи и нуклеиновых кислот изготовлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного соединения, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают путем сначала диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно промежуточного среднецепочечного спирта с образованием прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также описаны как термодинамически стабильные, изотропно чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизированы с помощью межфазных пленок поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают посредством комбинации трех-пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, ко-ПАВ и электролит. Тип микроэмульсии «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в) зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества, а также от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активных веществ (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм был тщательно исследован и дал специалисту в данной области техники исчерпывающие знания о том, как изготавливать микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, в

Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с обычными эмульсиями преимущество микроэмульсий заключается в обеспечении солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капель, которые образовались спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые при приготовлении микроэмульсий, включают, но не ограничиваются перечисленными, ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые простые эфиры, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокапрат декаглицерина (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), секвиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерина (DAO750), отдельно или в комбинации с ко-ПАВ. Ко-ПАВ, обычно короткоцепочечный спирт, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести посредством проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и, следовательно, создания нарушенной пленки из-за пустого пространства, созданного среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения ко-ПАВ, и не содержащие спирта самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы известны в данной области техники. Водная фаза, как правило, может представлять собой, но не ограничивается этим, воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, но не ограничивается этим, такие материалы как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные моно-, ди- и триглицериды (C8-C12), полиоксиэтилированные сложные эфиры глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C8-C10-глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенного всасывания лекарственных средств. Было предложено использование микроэмульсий на основе липидов (как м/в, так и в/м) для повышения биодоступности лекарственных средств при пероральном введении, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Преимущества микроэмульсий заключаются в обеспечении улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защите лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможном усилении всасывания лекарственного средства посредством индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембраны, легкости получения, легкости перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, повышении клинической активности и уменьшении токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802;

7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться спонтанно, когда их компоненты приводят в контакт при температуре окружающей среды. Это может быть особенно предпочтительным при изготовлении термолабильных лекарственных средств, пептидов или агентов РНКи. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических приложениях. Ожидается, что микроэмульсионные композиции и составы согласно настоящему изобретению будут способствовать повышению системного всасывания агентов РНКи и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшат локальное клеточное поглощение агентов РНКи и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как моностеарат сорбитана (Grill 3), Labrasol и усилители проникновения, для улучшения свойств состава и для усиления всасывания агентов РНКи и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Усилители проникновения, применяемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, можно классифицировать по принадлежности к одной из пяти широких категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие вещества, отличные от ПАВ (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

iii. Микрочастицы

Агент РНКи согласно настоящему изобретению может быть включен в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены путем высушивания распылением, но также могут быть получены с помощью других способов, включающих лиофилизацию, выпаривание, высушивание в псевдооживленном слое, высушивание в вакууме или комбинацию этих методик.

iv. Усилители проникновения

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении применяют различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, агентов РНКи, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствует в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только липидорастворимые или липофильные лекарственные средства легко пересекают клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут пересекать клеточные мембраны, если мембрану, подлежащую пересечению, обрабатывают усилителем проникновения. Помимо содействия диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточную мембрану усилители проникновения также усиливают проникновения липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения могут быть классифицированы по принадлежности к одной из пяти широких категорий, т.е., поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие вещества, отличные от ПАВ (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health

Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Каждый из вышеупомянутых классов усилителей проникновения более подробно описан ниже.

Поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные агенты») представляют собой химические соединения, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или поверхностное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего усиливается всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый простой эфир (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); и эмульсии перфторорганических соединений, таких как FC-43. (Takahashi *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые действуют как усилители проникновения, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀ алкиловые сложные эфиры (например, метил, изопропил и трет-бутил), а также их моно- и диглицериды (т.е., олеат, лаурат, капрат, миристан, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие дисперсии и всасыванию липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют в качестве усилителей проникновения. Таким образом, термин «соли желчных кислот» включает любой из встречающихся в природе компонентов желчи, а также любое из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту

(хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие агенты, применяемые в связи с настоящим изобретением, могут быть определены как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего усиливается всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, хелатирующие агенты имеют дополнительное преимущество, заключающееся в выполнении функции ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентного иона металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими агентами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие агенты включают, но не ограничиваются перечисленными, этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные бета-дикетонов (энамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

В настоящем документе усиливающие проникновение нехелатирующие соединения, отличные от ПАВ, могут быть определены как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатирующих агентов или поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, усиливают всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Данный класс усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканона (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92); и нестероидные противовоспалительные агенты, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Агенты, которые усиливают поглощение агентов РНКи на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие

как полилизин (WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение дцРНК.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно применять другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

Вспомогательные вещества

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «вспомогательное вещество» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым и выбрано с учетом планируемого способа введения с тем, чтобы обеспечить желаемый объем, консистенцию и т. д. при комбинировании с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, но не ограничиваются перечисленными, связывающие агенты (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.); и смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во вредные воздействия с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для изготовления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются перечисленными, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во вредные воздействия с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают,

но не ограничиваются перечисленными, воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Другие компоненты

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, с их уровнями использования, установленными в данной области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, локальные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, подходящие для физического изготовления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, вкусоароматические агенты, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загущающие агенты и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно мешать разным видам биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для корректировки осмотического давления, буферами, красителями, вкусоароматическими агентами или ароматическими веществами и т. п., которые не вступают во вредные взаимодействия с нуклеиновой кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции, охарактеризованные в настоящем изобретении, включают (а) один или более агентов РНКи и (b) один или более агентов, которые функционируют посредством механизма, отличного от РНКи, и которые можно применять при лечении связанного с НТТ расстройства. Примеры таких агентов включают, но не ограничиваются перечисленными, ингибиторы моноаминов, резерпин, противосудорожные агенты, антипсихотические агенты и антидепрессанты.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или у экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, для которых наблюдаются высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при установлении диапазона дозировки для применения у людей.

Дозировка композиций, охарактеризованных в настоящем документе, обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED_{50} с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах указанного диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, охарактеризованных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить на основании анализов клеточной культуры. Доза может быть установлена в моделях на животных для достижения некоторого диапазона циркулирующих концентраций соединения в плазме или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения уменьшенной концентрации полипептида), который включает IC_{50} (т. е. концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в культуре клеток. Такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз у людей. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждавшемуся выше, агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредуемых экспрессией нуклеотидного повтора. В любом случае, врач, проводящий введение, может регулировать количество и время введения агента РНКи на основании результатов, наблюдаемых при применении стандартных показателей эффективности, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе.

VII. Наборы

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения киРНК, например двухцепочечного соединения киРНК, или соединения оциРНК, (например, предшественника, например, более крупного соединения киРНК, которое может быть процессировано в соединение оциРНК, или ДНК, которая кодирует соединение киРНК, например, двухцепочечное соединение киРНК или соединение оциРНК, или его предшественника).

Такие наборы включают один или более агентов на основе дцРНК и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества агента(ов) на основе дцРНК. Агент на основе дцРНК, может находиться во флаконе или предварительно заполненном шприце. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для введения агента на основе дцРНК (например, устройство для инъекции, такое как предварительно заполненный шприц), или средства для измерения ингибирования СЗ (например, средства для измерения ингибирования мРНК НТТ, белка НТТ и/или активности НТТ). Такие средства для измерения ингибирования НТТ могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец СМЖ и/или плазмы крови. Наборы согласно

настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Согласно определенным вариантам реализации отдельные компоненты фармацевтического состава могут быть обеспечены в одном *контейнере*, например, во флаконе или в предварительно заполненном шприце. В качестве альтернативы, может быть желательным обеспечение компонентов фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, в одном контейнере для приготовления соединения кРНК, и по меньшей мере в другом - для соединения-носителя. Набор может быть упакован в виде нескольких различных конфигураций, таких как один или более контейнеров в одной коробке. Разные компоненты можно объединять, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно объединять в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. Набор также может включать устройство для доставки.

VII. Способы ингибирования экспрессии НТТ

Согласно настоящему изобретению также предложены способы ингибирования экспрессии гена НТТ в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с агентом РНКи, например, двухцепочечным агентом РНКи, композицией, содержащей агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композицией, содержащей агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии НТТ в клетке, ингибируя тем самым экспрессию НТТ в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают приведение клетки в контакт с двумя или более двухцепочечными агентами РНКи, описанными в настоящем документе, например, с первым агентом на основе дцРНК, нацеленным на экзон 1 человеческого НТТ, и вторым агентом на основе дцРНК, нацеленным на полноразмерный человеческий НТТ, например, с любыми двумя или более, например, 2, 3 или 4, из агентов на основе дцРНК, выбранных из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2-5. Согласно определенным вариантам реализации способов, включающих два или более агентов на основе дцРНК, указанные два или более агентов на основе дцРНК могут присутствовать в одной и той же композиции, в отдельных композициях или в любой их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению включают приведение клетки в контакт с композицией, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, например, первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ, например, любые два или более из агентов на основе дцРНК, выбранных из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2-5. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения НТТ преимущественно ингибируется в клетках ЦНС (например, головного мозга).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению, которые включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, как описано в настоящем документе, например, любыми двумя или более, например, 2, 3 или 4, из агентов на основе дцРНК, выбранных из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2-5, клетка может быть приведена в контакт с первым агентом (или композицией, содержащей первый агент) в первый момент времени, со вторым агентом (или композицией, содержащей второй агент) во второй момент времени, третьим агентом (или композицией, содержащей третий агент) в третий момент времени и четвертым агентом (или композицией, содержащей четвертый агент) в четвертый момент времени; или клетка может быть приведена в контакт со всеми агентами (или композицией, содержащей все агенты) одновременно. В качестве альтернативы, клетка может быть приведена в контакт с первым агентом (или композицией, содержащей первый агент) в первый момент времени и вторым, третьим и/или четвертым агентом (или композицией, содержащей второй, третий и/или четвертый агент) во второй момент времени. Также предусмотрены другие комбинации приведения клетки в контакт с двумя или более агентами (или композициями, содержащими два или более агентов на основе дцРНК) согласно настоящему изобретению.

Приведение клетки в контакт с агентом РНКи, например, двухцепочечным агентом РНКи, можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт с агентом РНКи *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт с агентом РНКи. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*.

Приведение клетки в контакт может быть прямым или опосредованным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение клетки в контакт может быть выполнено посредством нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc или любой другой лиганд, который направляет агент РНКи на представляющий интерес сайт.

Термин «ингибирование» в контексте настоящего документа используется взаимозаменяемо со «снижением», «сайленсингом», «отрицательной регуляцией», «подавлением» и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования. Согласно определенным вариантам реализации уровень ингибирования, например, для агента РНКи согласно настоящему изобретению, можно оценивать в условиях культуры клеток, например, в которых клетки в культуре клеток трансфицируют посредством трансфекции, опосредуемой Lipofectamine™, в концентрации 10 нМ или менее, 1 нМ или менее и т. д. вблизи клетки. Нокдаун в случае конкретного агента РНКи можно определить путем сравнения уровней до обработки в культуре клеток и уровней после обработки в культуре клеток, необязательно также путем сравнения с клетками, одновременно подвергнутыми обработке имеющей случайную последовательность формой

или другой формой контрольного агента РНКи. Таким образом, нокдаун в культуре клеток, например, предпочтительно на 50% или более, можно идентифицировать как свидетельство того, что произошло «ингибирование» или «снижение», «отрицательная регуляция» или «подавление» и т. д. Явным образом предусмотрено, что оценку уровней целевой мРНК или кодируемого белка (и, следовательно, степени «ингибирования» и т. д., вызванного агентом РНКи согласно настоящему изобретению) также можно оценивать в системах *in vivo* для агентов РНКи согласно настоящему изобретению в условиях, контролируемых надлежащим образом, как описано в данной области техники.

Выражение «ингибирование экспрессии гена НТТ» или «ингибирование экспрессии НТТ» в контексте настоящего документа включает ингибирование экспрессии любого гена НТТ (такого как, например, мышинный ген НТТ, крысиный ген НТТ, обезьяний ген НТТ или человеческий ген НТТ), а также вариантов или мутантов гена НТТ, которые кодируют белок НТТ. Таким образом, ген НТТ может представлять собой ген НТТ дикого типа, мутантный ген НТТ или трансгенный ген НТТ в контексте подвергнутой генетическим манипуляциям клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена НТТ» включает любой уровень ингибирования гена НТТ, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена НТТ, такое как ингибирование по меньшей мере на 20%. Согласно определенным вариантам реализации ингибирование составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, предпочтительно по меньшей мере 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или ниже уровня детектирования метода анализа.

Экспрессию гена НТТ можно оценить на основании уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена НТТ, например уровня мРНК НТТ или уровня белка НТТ, или, например, уровня мутантного белка НТТ.

Ингибирование можно оценить по уменьшению абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используется в данной области техники, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, который не подвергают обработке или обрабатывают с помощью контроля (такого как, например, только контрольный буфер или контрольный неактивный агент).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена НТТ ингибируется по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня детектирования анализа. Согласно определенным вариантам реализации способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии НТТ, например, продемонстрированное клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии НТТ.

Ингибирование экспрессии гена НТТ может проявляться снижением количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которой ген НТТ транскрибируется и которая подвергается обработке (например, путем контакта клетки или клеток с агентом РНКи согласно настоящему изобретению или путем введения агента РНКи согласно настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия гена НТТ ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но не подвергшейся такой обработке (контрольная(ые) клетка(и), не обработанная(ые) агентом РНКи или не обработанная(ые) агентом РНКи, нацеленным на представляющий интерес ген). Степень ингибирования может быть выражена в виде:

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

Согласно другим вариантам реализации ингибирование экспрессии гена НТТ можно оценить по уменьшению параметра, который функционально связан с экспрессией гена НТТ, например, экспрессией белка НТТ. Сайленсинг гена НТТ можно определить в любой клетке, экспрессирующей НТТ, будь то эндогенный или гетерологичный из конструкции для экспрессии, и с помощью любого анализа, известного в данной области техники.

Ингибирование экспрессии белка НТТ может проявляться снижением уровня белка НТТ, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объясняется выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогично выражено в виде процента от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которую можно применять для оценки ингибирования экспрессии гена НТТ, включает клетку или группу клеток, которая еще не была приведена в контакт с агентом РНКи согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток может быть получена от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) до лечения субъекта агентом РНКи.

Уровень мРНК НТТ, который экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определить с помощью любого способа, известного в данной области техники для оценки экспрессии мРНК. Согласно одному варианту реализации уровень экспрессии НТТ в образце определяют путем детектирования транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена НТТ. РНК может быть экстрагирована из клеток с применением методик экстракции РНК, включая, например, применение кислотной экстракции фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNAzol B; Biogenesis), с помощью наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализа, в которых применяется гибридизация рибонуклеиновых кислот,

включают ядерные кинетические анализы, ОТ-ПЦР, анализы с защитой от РНКаз, Нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ с использованием микромассива. Циркулирующую мРНК НТТ можно детектировать с применением способов, описанных в WO2012/177906, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии НТТ определяют с применением зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин «зонд» в контексте настоящего документа относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретной нуклеиновой кислотой или белком НТТ или их фрагментом. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть намеренно сконструированы так, чтобы содержать метку. Примеры молекул, которые можно применять в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно применять в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, Саузерн- и Нозерн-анализы, анализы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и массивы зондов. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК НТТ. Согласно одному варианту реализации мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК из геля в мембрану, такую как нитроцеллюлоза. Согласно альтернативному варианту реализации зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, в геномном чиповом массиве Affymetrix®. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы детектирования мРНК для применения в определении уровня мРНК НТТ.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии НТТ в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или применение обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, для мРНК в образце, например, с помощью ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант реализации, изложенный в Mullis, 1987, патент США № 4683202), цепную лигазную реакцию (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживаемую репликацию последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), систему транскрипционной амплификации Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликацию по типу катящегося кольца (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновых кислот с последующим детектированием амплифицированных молекул с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Эти схемы детектирования особенно полезны для детектирования молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения уровень экспрессии НТТ определяют с помощью количественной

флуорогенной ОТ-ПЦР (т. е. системы TaqMan™), с помощью анализа люциферазы Dual-Glo® или с помощью другого способа, признанного в данной области техники, для измерения экспрессии НТТ или уровня мРНК.

Уровень экспрессии мРНК НТТ можно отслеживать с применением мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, таком как Нозерн-, Саузерн-, дот-блот и т. п.), или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии НТТ также может включать применение зондов на основе нуклеиновых кислот в растворе.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в реальном времени (кПЦР). Применение данного способа ПЦР описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в настоящем документе. Такие способы также можно применять для детектирования нуклеиновых кислот НТТ.

Уровень экспрессии белка НТТ можно определить с применением любого способа, известного в данной области техники для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т.п. Такие анализы также можно применять для детектирования белков, указывающих на наличие или репликацию белков НТТ.

Согласно некоторым вариантам реализации эффективность способов согласно настоящему изобретению в лечении заболевания, связанного с НТТ, оценивают по уменьшению уровня мРНК НТТ (например, путем оценки уровня НТТ в образце СМЖ и/или образце плазмы крови, с помощью биопсии головного мозга или иным образом).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению агент РНКи вводят субъекту таким образом, что агент РНКи доставляется в конкретный сайт в организме субъекта. Ингибирование экспрессии НТТ можно оценить с помощью измерений уровня или изменения уровня мРНК НТТ или белка НТТ в образце, полученном из конкретного сайта в организме субъекта, например, клеток ЦНС. Согласно определенным вариантам реализации способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии НТТ, например, продемонстрированное клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии НТТ, таким как, например, стабилизация или ингибирование атрофии хвостатого ядра (например, при оценке с помощью объемной МРТ (vMRI)); стабилизация или снижение уровней легкой

цепи нейрофиламентов (Nfl) в образце СМЖ от субъекта, снижение мРНК мутантного НТТ или расщепленного мутантного белка НТТ, например, чего-либо одного или обоих из мРНК или белка полноразмерного мутантного НТТ и мРНК или белка расщепленного мутантного НТТ, и стабилизация или улучшение оценки по Единой шкале оценки болезни Хантингтона (UHDRS).

В настоящем документе термины, относящиеся к детектированию или определению уровня аналита, следует понимать, как означающие выполнение этапов для определения присутствия материала, например, белка, РНК. В настоящем документе способы детектирования или определения включают детектирование или определение уровня аналита, который ниже уровня детектирования для используемого способа.

IX. Способы лечения или предотвращения заболеваний, связанных с НТТ

Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения агента РНКи согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, двухцепочечных агентов РНКи согласно настоящему изобретению (например, каждый агент независимо нацелен на часть гена человеческого НТТ, такой как первый агент на основе дцРНК, нацеленный на экзон 1 человеческого НТТ, и второй агент на основе дцРНК, нацеленный на полноразмерный человеческий НТТ), композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей агент РНКи согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, композиций (например, фармацевтических композиций), каждая из которых независимо содержит агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, или композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, для снижения или ингибирования экспрессии НТТ в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК согласно настоящему изобретению, композицией согласно настоящему изобретению или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена НТТ, ингибируя тем самым экспрессию гена НТТ в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники. Например, снижение экспрессии НТТ можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК НТТ с применением способов, рутинных для обычного специалиста в данной области техники, например, с помощью Нозерн-блоттинга, кОТ-ПЦР; путем определения уровня белка НТТ с применением способов, рутинных для обычного специалиста в данной области техники, таких как Вестерн-блоттинг, иммунологические методики.

В способах согласно настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клетка, подходящая для обработки с применением способов согласно настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген НТТ. Клетка, подходящая для применения в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например клетку примата (такую как клетка

человека или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетку животного, отличного от примата (такую как клетка крысы или клетка мыши). Согласно одному варианту реализации клетка представляет собой клетку человека, например клетку ЦНС человека.

Экспрессия НТТ ингибируется в клетке по меньшей мере примерно на 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или примерно 100%, т. е. ниже уровня детектирования. Согласно предпочтительным вариантам реализации экспрессия НТТ ингибируется по меньшей мере на 50%.

Способы *in vivo* согласно настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции,

содержащий агент РНКи, причем указанный агент РНКи содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части транскрипта РНК гена НТТ млекопитающего, подлежащего лечению. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят две или более, например, 2, 3 или 4, композиции, каждая из которых независимо содержит агент РНКи согласно настоящему изобретению. Композиции могут быть одинаковыми или разными. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, каждый из которых независимо нацелен на часть гена НТТ.

Если подлежащий лечению организм представляет собой млекопитающее, такое как человек, композицию можно вводить с помощью любых способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, пероральный, внутривентрикулярный или парентеральный пути, включая внутримозговой (например, интравентрикулярный, внутримозговой и интратекальный), внутривенный, внутримышечный, интравитреальный, подкожный, чрескожный, воздушный (аэрозольный), назальный, ректальный и местный (включая буккальный и подязычный) введение. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем подкожной инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят посредством интратекальной инъекции.

Согласно некоторым вариантам реализации введение осуществляют посредством инъекции депо. Инъекция депо может высвобождать агент РНКи стабильным образом в течение продолжительного периода времени. Таким образом, инъекция депо может снижать частоту введения доз, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования НТТ или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо также может обеспечивать более стабильные концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. Согласно предпочтительным вариантам реализации инъекция депо представляет собой подкожную инъекцию.

Согласно некоторым вариантам реализации введение осуществляют с помощью насоса. Насос может представлять собой внешний насос или хирургически

имплантированный насос. Согласно определенным вариантам реализации насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. Согласно другим вариантам реализации насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно использовать для внутривенных, внутримышечных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. Согласно предпочтительным вариантам реализации инфузионный насос представляет собой насос для подкожной инфузии. Согласно другим вариантам реализации насос представляет собой хирургически имплантированный насос, который доставляет агент РНКи в ЦНС.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей обработке. Путь и место введения могут быть выбраны так, чтобы улучшить нацеливание.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения также предложены способы ингибирования экспрессии гена НТТ у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген НТТ в клетке млекопитающего и поддерживается у млекопитающего в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена НТТ, ингибируя тем самым экспрессию гена НТТ в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, и способов, например, кОТ-ПЦР, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК присутствует в композиции, такой как фармацевтическая композиция. Согласно некоторым вариантам реализации млекопитающему вводят два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации млекопитающему вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Снижение продукции белка можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, и способов, например, ИФА, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации образец биопсии ЦНС или образец спинномозговой жидкости (СМЖ) служит в качестве тканевого материала для отслеживания снижения экспрессии гена или белка НТТ (или, следовательно, прокси).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение субъекту агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, субъекту, который получит пользу от ингибирования экспрессии НТТ, в терапевтически эффективном количестве агента РНКи, нацеленного на ген НТТ, или фармацевтической композиции, содержащей агент РНКи, нацеленный на ген аНТТ. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый

субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены способы предотвращения, лечения или ингибирования прогрессирования связанного с НТТ заболевания или расстройства (например, болезни Хантингтона) у субъекта, например, прогрессирования связанного с НТТ заболевания или расстройства. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любого агента РНКи, например, агентов на основе дцРНК, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что предотвращает, обеспечивает лечение или ингибирует прогрессирование связанного с НТТ заболевания или расстройства у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению, которые включают введение двух или более агентов на основе дцРНК, как описано в настоящем документе, например, любых двух или более, например, 2, 3, или 4, из агентов на основе дцРНК, выбранных из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2-5, субъекту можно вводить первый агент (или композицию, содержащую первый агент) в первый момент времени, второй агент (или композицию, содержащую второй агент) во второй момент времени, третий агент (или композицию, содержащую третий агент) в третий момент времени и четвертый агент (или композицию, содержащую четвертый агент) в четвертый момент времени; или субъекту можно вводить все агенты (или композицию, содержащую все агенты) одновременно. В качестве альтернативы, субъекту можно вводить первый агент (или композицию, содержащую первый агент) в первый момент времени и второй, третий и/или четвертый агент (или композицию, содержащую второй, третий и/или четвертый агент) во второй момент времени. Также предусмотрены другие комбинации приведения клетки в контакт с двумя или более агентами согласно настоящему изобретению.

Агент РНКи согласно настоящему изобретению можно вводить в виде «свободного агента РНКи». Свободный агент РНКи вводят в отсутствие фармацевтической композиции. «Голый» агент РНКи может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. Согласно одному варианту реализации буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего агент РНКи, можно регулировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы, агент РНКи согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальный состав дцРНК.

Субъекты, которые получают пользу от снижения или ингибирования экспрессии гена НТТ, представляют собой субъектов, имеющих связанное с НТТ заболевание, например болезнь Хантингтона.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы применения агента РНКи или его фармацевтической композиции, например, для лечения субъекта, который получит пользу от снижения или ингибирования экспрессии НТТ, например, субъекта, имеющего связанное с НТТ расстройство, в комбинации с другими фармацевтическими средствами или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими средствами или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые в настоящее время применяются для лечения этих расстройств. Например, в определенных вариантах реализации агент РНКи, нацеленный на НТТ, вводят в комбинации, например, с агентом, пригодным для лечения связанного с НТТ расстройства, описанным в другом месте в настоящем документе или иным образом известным в данной области техники. Например, дополнительные агенты, подходящие для лечения субъекта, который получит пользу от снижения экспрессии НТТ, например, субъекта, имеющего связанное с НТТ расстройство, могут включать агенты, применяемые в настоящее время для лечения симптомов НТТ. Агент РНКи и дополнительные терапевтические агенты можно вводить одновременно или в одной и той же комбинации, например, интратекально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции или в отдельные моменты времени или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанного в настоящем документе.

Примерные дополнительные терапевтические средства включают, например, ингибитор моноаминов, например, тетрабеназин (Ксеназин), дейтетрабеназин (Аустедо) и резерпин, противосудорожное средство, например, вальпроевую кислоту (депакот, депакен, депакон) и клоназепам (клонопин), антипсихотический агент, например, рисперидон (риспердал) и галоперидол (галдол), и антидепрессант, например, пароксетин (паксил).

Согласно одному варианту реализации способ включает введение композиции, охарактеризованной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия целевого гена НТТ уменьшается в течение по меньшей мере одного месяца. Согласно предпочтительным вариантам реализации экспрессия уменьшается в течение по меньшей мере 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев.

Предпочтительны агенты РНКи, пригодные для способов и композиций, охарактеризованных в настоящем документе, специфично нацелены на РНК (первичную или процессированную) целевого гена НТТ. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с применением агентов РНКи можно получать и выполнять, как описано в настоящем документе.

Введение дцРНК в соответствии со способами согласно настоящему изобретению может приводить к снижению тяжести, признаков, симптомов или маркеров таких заболеваний или расстройств у пациента с расстройством, связанным с НТТ. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое или клинически значимое уменьшение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или примерно 100%.

Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптома, снижения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания терапевтического эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое лечат или которое является мишенью для предотвращения. Специалист в данной области техники может отслеживать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения связанного с НТТ расстройства можно оценить, например, путем периодического отслеживания состояния субъекта. Сравнения более поздних показаний с первоначальными показаниями дают врачу показатель эффективности лечения. Специалист в данной области техники может отслеживать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением агента РНКи, нацеленного на НТТ, или его фармацевтической композиции, «эффективный против» связанного с НТТ расстройства указывает на то, что введение клинически подходящим образом приводит к благоприятному эффекту для по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, например, улучшению симптомов, излечению, снижению интенсивности заболевания, продлению жизни, улучшению качества жизни, или другому эффекту, который в целом признан как положительный врачами, знакомыми с лечением связанных с НТТ расстройств и связанных с ними причин.

Терапевтический или профилактический эффект является очевидным, если наблюдается статистически значимое улучшение одного или более параметров статуса заболевания или отсутствие усугубления или отсутствие развития симптомов, которые можно было бы ожидать в противном случае. В качестве примера, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% измеримого параметра заболевания и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может указывать на эффективное лечение. Эффективность для данного лекарственного средства на основе агента РНКи или состава этого лекарственного средства также можно оценить с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, известной в данной области техники. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения подтверждается, если наблюдается статистически значимое снижение маркера или симптома.

В качестве альтернативы, эффективность может быть измерена по снижению

степени тяжести заболевания, согласно определению специалистом в области диагностики на основании клинически принятой шкалы оценки степени тяжести заболевания. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению степени тяжести заболевания, измеренное с использованием подходящей шкалы, представляет надлежащее лечение с применением агента РНКи или состава агента РНКи, описанного в настоящем документе.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество дцРНК, такое как от примерно 0,01 мг/кг до примерно 200 мг/кг.

Агент РНКи можно вводить интратекально, *путем* интравитреальной инъекции или путем внутривенной инфузии в течение определенного периода времени, на регулярной основе. Согласно определенным вариантам реализации после начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Введение агента РНКи может снижать уровни НТТ, например, в клетке, ткани, крови, образце СМЖ или другом компартменте пациента, по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере примерно 99% или более. Согласно предпочтительному варианту реализации введение агента РНКи может снижать уровни НТТ, например, в клетке, ткани, крови, образце СМЖ или другом компартменте пациента, по меньшей мере на 50%.

Перед введением полной дозы агента РНКи пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузионная реакция, и отслеживать нежелательные эффекты, такие как аллергическая реакция. В другом примере у пациента можно отслеживать нежелательные иммуностимулирующие эффекты, такие как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

В качестве альтернативы, агент РНКи можно вводить подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Одну или более инъекций можно применять для доставки субъекту желаемой, например, ежемесячной дозы агента РНКи. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. Согласно определенным вариантам реализации после начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества агента РНКи на регулярной основе, например, ежемесячное введение или продление до одного раза в квартал, дважды в год, один раз в год. Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи вводят от примерно одного раза в месяц до примерно одного раза в квартал (т. е. примерно один раз в три месяца).

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию обычного специалиста в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что при практической реализации или тестировании агентов РНКи и способов, охарактеризованных в настоящем изобретении, могут применяться способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, ниже описаны подходящие способы и материалы. Все публикации, заявки на патенты,

патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, имеет преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Разработка, синтез, отбор и оценка *in vitro* агента РНКи

В данном примере описаны способы разработки, синтеза, отбора и оценки *in vitro* агентов РНКи НТТ.

Источник реагентов

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

Биоинформатика

киРНК, нацеленные на транскрипт человеческого хантингтина (НТТ; человеческий NCBI refseqID NM_002111.8; NCBI GeneID: 3064), конструировали с применением пользовательских скриптов R и Python. Человеческая мРНК NM_002111 REFSEQ, версия 8, имеет длину 13498 оснований.

Подробный перечень немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи НТТ показан в Таблице 2. Подробный перечень модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи НТТ показан в Таблице 3.

Следует понимать, что по всей заявке название дуплекса без десятичного разделителя эквивалентно названию дуплекса с десятичным разделителем, которое просто ссылается на номер партии дуплекса. Например, AD-564727 является эквивалентом AD-564727.1.

Выделение общей РНК с помощью набора для выделения мРНК DYNABEADS

РНК выделяли с применением автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с применением DYNABEAD (Invitrogen, № по каталогу 61012). В общих чертах, 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных частиц, добавляли в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем магнитные частицы захватывали и надосадочную жидкость удаляли. Связанную с гранулами РНК затем промывали 2 раза с использованием 150 мкл промывочного буфера А и один раз с использованием промывочного буфера В. Затем гранулы промывали с использованием 150 мкл элюирующего буфера, повторно захватывали и удаляли надосадочную жидкость.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния, США, № по каталогу 4368813)

Десять мкл мастер-смеси, содержащей 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X дНТФ, 1 мкл

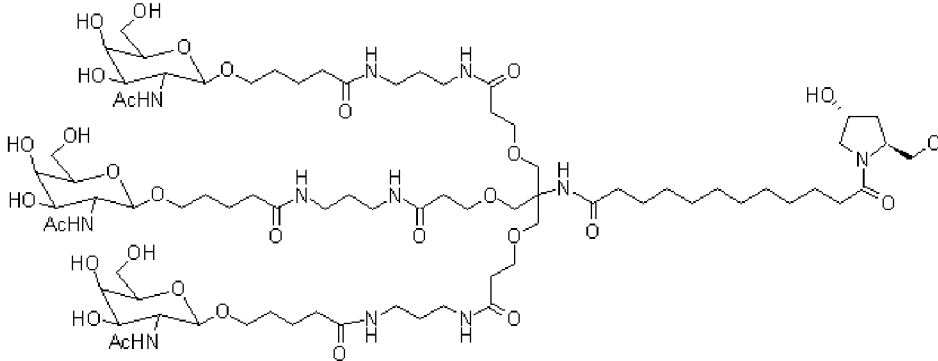
10х случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O на реакцию, добавляли к выделенной РНК, как описано выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре с последующей 2-часовой инкубацией при 37°C.

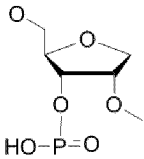
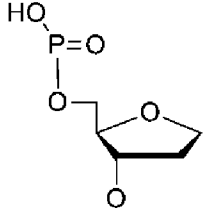
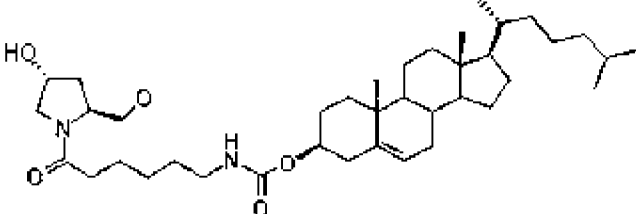
ПЦР в режиме реального времени

Два мкл кДНК добавляли к мастер-смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH человека или мыши TaqMan (ThermoFisher, № по каталогу 4352934E или 4351309), и 0,5 мкл соответствующего зонда НТТ (коммерчески доступного, например, от Thermo Fisher) и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали с N=4, и данные нормировали к клеткам, трансфицированным нецелевой контрольной кРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные, полученные в режиме реального времени, анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормировали к анализам, выполненным с соответствующим контролем.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что мономеры, присутствующие в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями; и следует понимать, что если нуклеотид содержит 2'-фтор-модификацию, то фтор заменяет гидроксильную группу в этом положении в исходном нуклеотиде (т. е. это 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотид).

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфотиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат

Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил)]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3 

Y34	2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе фураноза) 
Y44	инвертированная лишняя азотистых оснований ДНК (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат) 
L10	N-(холестеринкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol) 
(Agn)	S-изомер аденозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Cgn)	S-изомер цитидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Ggn)	S-изомер гуанозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Tgn)	S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
P	Фосфат
VP	Винилфосфонат
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-деоксиуридин
dUs	2'-деоксиуридин-3'-фосфотиоат

(Ahd)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат
(Ahds)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфотиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфотиоат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Ghds)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфотиоат
(C2p)	цитидин-2'-фосфат
(G2p)	гуанозин-2'-фосфат
(U2p)	уридин-2'-фосфат
(A2p)	аденозин-2'-фосфат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК НТТ

Идентификатор дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловый диапазон в NM_002111.8
AD-1271085 (FL)	GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA	15	UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU	16	4398-4420
AD-1271083 (FL)	UCAUAAUCACAUUCGUUUGUA	25	UACAAACGAAUGUGAUUAUGAAU	29	4403-4425
AD-1271084 (FL)	GCUGGUGAAUCGGAUUCUGA	26	UCAGGAAUCCGAUUCACCAGCUC	30	6512-6534
AD-1271082 (экзон 1)	UGGAAAAGCUGAUGAAGGCCA	27	UGGCCUTCAUCAGCUUUUCCAGG	31	154-176
AD-1019465 (экзон 1)	CCAUGGCGACCCUGGAAAAGA	28	UCUUUCCAGGGUCGCCAUGGCG	32	142-164

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК НТТ

Идентификатор дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:
AD-1271085 (FL)	gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa	17	VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu	18
AD-1271083 (FL)	uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa	19	VPusAfscAAfcGfAfauguGfaUfuaugasasu	20
AD-1271084 (FL)	gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfkgauuccusgsa	21	VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc	22
AD-1271082 (экзон 1)	usgsgaa(Ahd)AfgCfUfGfaugaaggcsesa	23	VPusGfsgccu(Tgn)caucagCfuUfuuccasgsg	24

Пример 2. Оценка *in vivo* агентов РНКи, нацеленных на НТТ

Дуплексы, представляющие интерес, нацеленные на полноразмерный (FL) человеческий НТТ или экзон 1 человеческого НТТ, оценивали *in vivo* у приматов, отличных от человека. Дуплексы синтезировали и получали с применением способов, известных в данной области техники.

Немодифицированные нуклеотидные последовательности смысловых и антисмысловых цепей представляющих интерес дуплексов представлены в Таблице 2 выше. Модифицированные нуклеотидные последовательности смысловых и антисмысловых цепей представляющих интерес дуплексов представлены в Таблице 3 выше.

Самцам приматов, отличных от человека, массой 3-4 кг, интратекально вводили однократную дозу 60 мг в объеме 2 мл AD-1019465 (нацеленного на экзон 1 человеческого НТТ; см. РСТ заявку №: РСТ/US2020/057849, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), AD-1271082 (нацеленного на экзон 1 человеческого НТТ) или AD-1271085 (нацеленного на полноразмерный человеческий НТТ) (n=5 на дуплекс) в течение приблизительно 3 минут с помощью болюса вручную с последующей промывкой 0,3 мл искусственной СМЖ (ИСМЖ), или искусственную ИСМЖ в День 1. Образцы плазмы крови собирали в День -7 до введения дозы и через 0,5 часа, 2 часа, 8 часов, 24 часа после введения дозы и в Дни 8, 15, 36 и 43 после введения дозы. Образцы спинномозговой жидкости (СМЖ) собирали в День -7 до введения дозы и в Дни 2, 8, 15, 36, 43 после введения дозы из задней мозжечково-мозговой цистерны и в День 1 до введения дозы из поясничного интратекального пространства. В День 43 после введения дозы животных умерщвляли, перфузировали физиологическим раствором и собирали ткани. Ткани фиксировали формалином и немедленно замораживали для анализов уровней киРНК, иммуногистохимических (ИНС) анализов и анализов гибридизации *in situ* (ISH). Собранные ткани включали головной мозг (префронтальная кора, височная кора, гиппокамп, ствол головного мозга, мозжечок, стриатум (хвостатое ядро и путамен/бледный шар), спинной мозг (шейный, грудной, поясничный), печень, почку и сердце.

Как отображено на Фигуре 1, у животных, имеющих >1000 нг/мл киРНК в СМЖ через 24 часа после введения дозы, наблюдали сильный нокдаун мРНК НТТ по всему головному мозгу и позвоночнику, что указывает на успешное интратекальное введение. Введение дуплексов, нацеленных на полноразмерный НТТ (AD-1271085), приводило к нокдауну мРНК НТТ примерно на 80% в коре головного мозга и гиппокампе и примерно на 60% в стриатуме, и введение дуплексов, нацеленных на экзон 1 НТТ (AD-1271082 и AD-1019465), приводило к нокдауну мРНК НТТ примерно на 60-70% в коре головного мозга и гиппокампе и примерно на 30% в стриатуме.

На Фигуре 2 в табличном виде приведены значения графика, отображенного на Фигуре 1. Из-за характерной технической вариабельности интратекального введения доз в качестве индикатора успешного введения доз использовали уровни киРНК в СМЖ через 24 часа после введения дозы. Животных с уровнями киРНК <1000 нг/мл исключали из анализа.

На Фигурах 3А-3Е показано, что в дополнение к СМЖ из задней мозжечково-мозговой цистерны (Фигура 3А) кРНК можно детектировать в областях по всему головному мозгу после интратекального введения. В частности, самую высокую концентрацию кРНК детектировали в образцах из грудного отдела позвоночника от всех животных после интратекального введения дуплексов в диапазоне 2154-25030 нг/г (Фигура 3Е). Следующую самую высокую концентрацию кРНК детектировали в образцах префронтальной коры головного мозга в диапазоне 104-26681 нг/г, при этом 2 образца имели концентрации кРНК ниже нижнего предела количественного определения (НПКО) (Фигура 3В). Концентрация кРНК в хвостатом ядре находилась в диапазоне 204-2953 нг/г, при этом 7 образцов имели уровни кРНК НПКО (Фигура 3С) и, наконец, в путамене диапазон концентрации кРНК составил 134-2463 нг/г, при этом 8 образцов имели концентрации кРНК НПКО (Фигура 3Д).

Кроме того, и как продемонстрировано на Фигурах 4А-4Д, тканевые уровни кРНК коррелировали с нокдауном транскрипта НТТ для всех тестируемых дуплексов. Кроме того, как продемонстрировано на Фигуре 5А, в дополнение к влиянию на ткани головного мозга и спинного мозга интратекальное введение дуплексов приводило к повышению уровней кРНК в образцах плазмы крови у приматов, отличных от человека, которым вводили однократную дозу 60 мг дуплекса. Кроме того, как продемонстрировано на Фигуре 5В, низкие уровни в СМЖ коррелировали с более высокими уровнями в плазме крови уже через 30 минут после интратекального введения дозы и *наоборот*. Эти данные демонстрируют, что уже через 30 минут после интратекального введения доз можно собирать образцы плазмы крови для определения качества интратекального введения в качестве альтернативы 24-часовому тестированию СМЖ.

Пример 3. Оценка *in vivo* агентов РНКи, нацеленных на полноразмерный НТТ

Дуплексы, представляющие интерес, нацеленные на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085, AD-1271084 и AD-1271083), или антисмысловой олигонуклеотидный агент, томинерсен, оценивали в модели болезни Хантингтона на мышах (HD), модели HD на мышах YAC128. Мыши YAC128 несут в своих геномах искусственную хромосому дрожжей (YAC), содержащую полный ген HD человека, содержащий 128 повторов CAG. У мышей YAC128 развиваются двигательные отклонения и возрастная атрофия головного мозга, включая кортикальную и стриатальную атрофию, связанную с потерей стриатальных нейронов. У мышей YAC128 проявляется начальная гиперактивность с последующим началом двигательного дефицита и, наконец, гипокинезом (см., например, Slow, *et al.* (2003) *Human Molecular Genetics* 12(13):1555; Van Raamsdonk, *et al.* (2005), *Human Molecular Genetics* 14(24):3823; и Carroll, *et al.* (2011) *Neurobiology of Disease* 43:257-265).

В День 0 мышам YAC128 (возраст 7-13 недель, $27,7 \pm 3,4$ грамма, n=36) вводили однократную дозу 300 мкг/кг представляющих интерес агентов или контрольной искусственной СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). В День 14 после введения дозы животных умерщвляли, собирали образцы фронтальной коры головного мозга и быстро замораживали в жидком азоте, и мРНК экстрагировали и

анализировали с помощью способа ОТ-кПЦР.

Эффект этих агентов в отношении мРНК полноразмерного мутантного человеческого НТТ показан на Фигуре 6А. Эти данные демонстрируют, что примерные протестированные дуплексы эффективно снижают уровень матричной РНК мутантного человеческого НТТ *in vivo*.

Уровни полноразмерного мутантного человеческого белка НТТ определяли с использованием анализа методом Вестерн-блоттинга.

В общих чертах, образцы фронтальной коры головного мозга гомогенизировали в буфере RIPA вместе с ингибиторами протеаз. Общий белок определяли количественно с использованием набора Pierce BCA в соответствии с инструкциями производителя. Восемьдесят мкг общего лизата клеток денатурировали путем кипячения в 4х буфере LDS и подвергали электрофорузу в ДСН-ПААГ в 3-8% трис-ацетатном градиентном геле и переносили на мембраны PVDF. Блоты блокировали блокирующим буфером Odyssey в течение 1 часа при комнатной температуре и гибридизовали со специфичными антителами в течение ночи при 4°C. Использовали следующие антитела: НТТ (Millipore, № по каталогу MAB2166), кальнексин (Millipore-Sigma, № по каталогу C4731, флуоресцентно-конъюгированные вторичные антитела (Licor, козье антитело против белка кролика, № по каталогу 926-32211 и ослиное антитело против белка мыши, № по каталогу 926-680721:5000). Детектирование белковых полос осуществляли с использованием системы визуализации Biorad Chemidoc MP. Плотность каждой полосы НТТ нормировали к контрольной загрузке кальнексином, и нормированную интенсивность использовали для количественного определения нокдауна НТТ в образцах, обработанных миРНК, по сравнению с образцами, обработанными контрольным носителем (1X ФСБ).

Эффект этих агентов на уровни мутантного человеческого белка НТТ показан на Фигуре 6В. Эти данные демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК полноразмерного мутантного человеческого НТТ *in vivo*.

Пример 4. Оценка *in vivo* агентов РНКи, нацеленных на полноразмерный НТТ или экзон 1 НТТ

Дуплексы, представляющие интерес, нацеленные на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085) или экзон 1 человеческого НТТ (AD-1271082 или AD-1019465), оценивали в признанной в данной области техники модели болезни Хантингтона (HD) на мышцах, модели HD у гетерозиготных мышей Q175DN (см., например, Menalled, *et al.* (2012) *PLoS One* 7(12):e49838. doi: 10.1371/journal.pone.0049838). У мышей Q175DN экзон 1 мышинового НТТ заменен введенной (knock-in) последовательностью экзона 1 человеческого НТТ, имеющей приблизительно 180-220 повторов CAG-тракта. В этой модели HD на мышцах наблюдаются двигательные, когнитивные, молекулярные и электрофизиологические отклонения, включая *in vivo* уменьшение нескольких стриатальных маркеров, и отличительные черты HD, подобные таковым у пациентов с HD. Например, у гомозиготных мышей наблюдаются отклонения двигательной активности и

силы захвата с ранним началом (в возрасте 8 и 4 недель, соответственно) с последующими нарушениями в тесте вращающегося стержня и лазательной активности в возрасте 30 недель, а также когнитивные расстройства в возрасте примерно 1 года. У гетерозиготных мышей в возрасте примерно 4,5 месяца также наблюдаются явные поведенческие нарушения, в частности, в темной фазе суточного цикла. У гетерозигот и гомозигот наблюдается уменьшение массы тела, а также значимое уменьшение выживаемости у гомозигот. Кроме того, с 12-недельного возраста наблюдается раннее и значимое уменьшение стриатальных генных маркеров.

В День 0 приблизительно пятинедельным гетерозиготным мышам Q175DN (также называемым KI-мышами Q175) (обоих полов) вводили однократную дозу 300 мкг представляющих интерес агентов, контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) или не целенный на HTT агент на основе дцРНК (контроль) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Мышей дикого типа также включали в исследуемую группу для контроля экспрессии транскрипта *Htt* в начальных условиях. Дизайн исследования обобщен в Таблице ниже.

Идентификатор группы	Обработка	Тестируемый препарат, ICV	Генотип	Размер группы (n)	Мишень
1	Si-контроль	ИСМЖ	Q175 KI	n=5	Контроль
2	Si1	AD-1271085	Q175 KI	n=5	HTT-FL
3	Si2	AD-1271082	Q175 KI	n=5	HTT-Ex1
4	Si3	AD-1019465	Q175 KI	n=6	HTT-Ex1
5	Si4	AD-1025211	Q175 KI	n=3	SNCA (ненацеливающий контроль)
6	Отсутствует	Отсутствует	ДТ	n=3	Контроль

Через 4 недели после инъекции у мышей собирали образцы головного и спинного мозга. Один образец спинного мозга (поясничная область) и один образец стриатума от каждой мыши использовали для анализа уровней РНК вариантного *Htt* QuantiGene. В качестве референсных контролей для анализов QuantiGene использовали трех необработанных мышей ДТ. Один дополнительный образец спинного мозга (поясничная область) и один образец стриатума от каждой мыши использовали для анализа Meso Scale Discovery (MSD) для определения уровней белка *Htt* дикого типа и мутантного белка *Htt*.

Панель QuantiGene для оценки транскрипта *Htt* представлена в Таблице ниже. Уровни экспрессии *Atp5b*, *Eif4a2* и *Gapdh* служили в качестве референсных генных

контролей. Схема части транскрипта *Htt*, оцененного с помощью каждого анализа панели QuantiGene, отображена на Фигуре 7.

Обозначение мишени	Название	Доступ в GenBank
Htt-I1-pA1	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.)	
Htt-I1-pA2	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 с полиА-сайтом 2 (вариант с 1145 п. о.)	
Htt-I1-3'	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 на его 3'-конце	
Htt-I3	Htt (мышинный эндогенный), интрон 3	
Htt-FL-(экзоны 50-53)	Хантингтин, полноразмерный (общий)	NM_010414
Atp5b	АТР-синтаза, H ⁺ транспортирующий митохондриальный комплекс F1, бета-субъединица	NM_016774
Eif4a2	Эукариотический фактор инициации трансляции 4A2	NM_013506
Gapdh	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	NM_001289726

Статистические сравнения, выполненные в этом исследовании, представляли собой

(1) Группы лечения 2-5 в сравнении с обработанными Si-контролем КИ-мышами Q175 (дисперсионный анализ с критерием Даннета для множественных сравнений); и

(2) Группа лечения 1 (Si-контроль) в сравнении с группой 6 (мышь ДТ, не подвергнутые обработке): непарный t-критерий. Это сравнение служило в качестве контроля модельного (генотипического) эффекта для проверки того, что уровни интронных транскриптов *Htt* (Htt-I1-pA1 и Htt-I1-pA2) повышаются у животных Q175, как и ожидалось (в данном возрасте).

На Фигурах 8А-8Е отображены результаты анализа QuantiGene.

Как отображено на Фигурах 8А и 8В, введение всех агентов AD-1271085, AD-1271082 или AD-1019465 ингибирует экспрессию интрона 1 с полиА-сайтом 1 эндогенного мышинового *Htt* (вариант с 680 п. о.) и интрона 1 с полиА-сайтом 2 эндогенного мышинового *Htt* (вариант с 1145 п. о.) в стриатуме и спинном мозге. По сравнению с контрольной ИСМЖ интрацеребровентрикулярная инъекция AD-1271082 (нацелен на экзон 1 человеческого НТТ) ингибирует экспрессию интрона 1 с полиА-сайтом 1 эндогенного мышинового *Htt* (вариант с 680 п. о.) в стриатуме примерно на 30% и экспрессию интрона 1 с полиА-сайтом 2 эндогенного мышинового *Htt* (вариант с 1145 п. о.) в стриатуме примерно на 18%. На Фигуре 8С аналогично продемонстрировано, что введение всех агентов ингибирует экспрессию полноразмерного *Htt* в спинном мозге и стриатуме. По сравнению с контрольной ИСМЖ введение AD-1271085 ингибировало экспрессию полноразмерного *Htt* примерно на 52% в стриатуме, введение AD-1271082 ингибировало экспрессию полноразмерного *Htt* примерно

на 39% в стриатуме, и введение AD-1019465 ингибировало экспрессию полноразмерного Htt примерно на 18% в стриатуме. Кроме того, и как ожидалось, ни один из агентов не ингибировал экспрессию Htt, как показано с применением анализов нижележащих интронов (см. Фигуры 8D и 8E).

Результаты анализа MSD для детектирования мутантного белка НТТ отображены на Фигуре 8F, и результаты анализа MSD для детектирования экзона 1 белка НТТ дикого типа отображены на Фигуре 8G.

Как отображено на Фигурах 8F и 8G, все протестированные дуплексы показали некоторый уровень нокдауна белка Htt, как и ожидалось, исходя из их варьирующей активности в отношении транскрипта и специфичности нацеливания. В частности, нокдаун белка Htt дикого типа наблюдается только с AD-1271085, поскольку этот дуплекс нацелен только на мышинный ген дикого типа (Фигура 8G). Как AD-1019465, так и AD-102521 нацелены только на экзон 1 человеческого НТТ, и, по-видимому, они не оказывали эффекта на полноразмерный мышинный белок (Фигура 8G). Однако тщательное изучение данных, в частности, для групп 3 и 4 на Фигуре 8G, показывает, что существует одно выпадающее значение, которое приводит к отклонению среднего значения, и, таким образом, имеется KD белка (показано с помощью KD транскрипта на Фигуре 8C). Кроме того, как отображено на Фигуре 8F, как AD-1019465, так и AD-102521 приводили к сильному нокдауну мутантного Htt в спинном мозге и стриатуме.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК НТТ и белка Htt *in vivo*.

Пример 5. Нокдаун белка НТТ *in vivo* с использованием агентов РНКи, нацеленных на полноразмерный НТТ или экзон 1 НТТ.

Оценивали способность представляющих интерес дуплексов, нацеленных на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085) или экзон 1 человеческого НТТ (AD-1271082 или AD-1019465), обеспечивать нокдаун белка НТТ дикого типа в различных нейрональных тканях приматов, отличных от человека. В частности, самцам приматов, отличных от человека, массой 3-4 кг, интратекально вводили однократную дозу 60 мг в объеме 2 мл AD-1019465 (n=5), AD-1271082 (n=5) или AD-1271085 (n=5) в течение приблизительно 3 минут с помощью болюса вручную с последующей промывкой 0,3 мл искусственной СМЖ (ИСМЖ), или искусственную ИСМЖ (n=5) в День 1. В День 45 после введения дозы животных умерщвляли, перфузировали физиологическим раствором и собирали ткани. Ткани быстро замораживали для анализа Meso Scale Discovery (MSD). Собранные ткани включали префронтальную кору головного мозга, гиппокамп, хвостатое ядро стриатума, поясничный отдел позвоночника и грудной отдел позвоночника.

Как отображено на Фигуре 9, после подавления транскрипта НТТ уровень белка НТТ также снижался до различных уровней, вероятно, отражающих различную активность протестированных дуплексов кРНК. Максимальное ингибирование наблюдали в тканях префронтальной коры и гиппокампа у животных, которым вводили AD-1271085.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что примерные протестированные

дуплексные агенты эффективно снижают уровень белка НТТ *in vivo*.

В другом исследовании для оценки способности однократной дозы 60 мг AD-1271085, введенной интратекально, обеспечивать нокдаун белка НТТ дикого типа в различных нейрональных тканях приматов, отличных от человека, в течение 168 дней, начиная со Дня 49 после введения дозы, у трех из 15 животных, которым вводили дуплекс, наблюдали поздние «нежелательные» клинические признаки (длительные треморы, судороги, потерю координации и уменьшение активности), которые не наблюдались в предшествующих исследованиях. Животных умерщвляли и исследование останавливали. Впоследствии было отмечено, что снижение дозы опосредовало кажущийся нежелательный эффект, наблюдаемый в этом исследовании. См., например, Пример 10, ниже.

Пример 6. Анализы зависимости активности от структуры дуплексов, нацеленных на экзон 1 человеческого НТТ

Выполняли анализ зависимости активности от структуры дуплексов, нацеленных на экзон 1 человеческого НТТ, и оценивали эффективность этих агентов у мышей YAC128.

Подробный перечень немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей НТТ, сконструированных и синтезированных на основании этого анализа, показан в Таблице 4. Подробный перечень модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей НТТ, сконструированных и синтезированных на основании этого анализа, показан в Таблице 5.

В День 0 и в День 14 мышам YAC128 (возраст 7-13 недель, $27,7 \pm 3,4$ г, $n=36$) вводили дозу 300 мкг/кг AD-1019476, дозу 600 мкг/кг AD-1019476, дозу 300 мкг/кг AD-1443080, дозу 600 мкг/кг AD-1443080, дозу 600 мкг/кг AD-1443079, дозу 300 мкг/кг A-1800326 (антисмысловый олигонуклеотид, томинерсен) или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV).

В День 28 после введения дозы животных умерщвляли, и собирали образцы всего полушария и быстро замораживали в жидком азоте. мРНК и белок экстрагировали из образцов и анализировали с помощью метода ОТ-кПЦР или метода Вестерн-блоттинга, как описано выше.

Эффект этих агентов на мРНК мутантного полноразмерного человеческого НТТ показан на Фигуре 10А, и эффект этих агентов на мРНК полноразмерного мышинового НТТ дикого типа показан на Фигуре 10В и показывает, что агенты не приводят к нокдауну человеческого мутантного транскрипта. Однако, как отображено на Фигурах 10С и 10D, при применении антитела MAB2166 (Millipore, № по каталогу MAB2166; связывается с областью из 15 амк., охватывающей аминокислоты 445-459 человеческого белка НТТ) для всех протестированных агентов и доз как полноразмерный мышинный белок НТТ дикого типа, так и мутантный полноразмерный человеческий белок НТТ практически не поддаются детектированию, что демонстрирует замечательную эффективность агентов в снижении уровня белка.

Для подтверждения эффекта агентов на уровень полноразмерного мышинового белка НТТ дикого типа и мутантного полноразмерного человеческого белка НТТ анализ методом

Вестерн-блоттинга повторяли с применением второго антитела D7F7 (Cell Signaling Technology) и, как отображено на Фигурах 10Е и 10F, протестированные агенты и дозы демонстрировали еще раз замечательную эффективность в снижении уровня полноразмерного мышинового белка НТТ дикого типа и мутантного полноразмерного человеческого белка НТТ.

Пример 7. Анализы зависимости ответа от дозы дуплексов, нацеленных на экзон 1 человеческого НТТ

Проводили анализ зависимости ответа от дозы для определения наилучшей дозы агентов для дифференцирования активности агентов.

В День 0 мышам YAC128 (самцы и самки, в возрасте 6 недель, n=3, за исключением дозы 300 мкг, где n=2) вводили однократную дозу 37,5 мкг, 75 мкг, 150 мкг или 300 мкг AD-1019476 или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). В День 14 после введения дозы животных умерщвляли, оба полушария головного мозга собирали и быстро замораживали в жидком азоте. Белок экстрагировали и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с применением антител MAB2166 или D7F7.

Результаты этого анализа представлены на Фигурах 11А и 11В и демонстрируют, что однократная доза 75 мкг AD-1019476 обеспечивает максимальную эффективность нокдауна.

Пример 8. Оценка *in vivo* агентов РНКи, нацеленных на полноразмерный НТТ или экзон 1 НТТ

Дуплексы, представляющие интерес, нацеленные на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085) или экзон 1 человеческого НТТ (AD-1498524 или AD-1019448), оценивали в модели HD на гетерозиготных мышах Q175DN. Мыши Q175DN несут введенную последовательность экзона 1 человеческого НТТ, имеющую приблизительно 180-220 повторов CAG-тракта, которая заменяет экзон 1 мышинового НТТ.

В День 0 приблизительно 9-месячным гетерозиготным мышам Q175DN (также называемым мышами Q175 HET) (обоих полов) вводили однократную дозу 300 мкг представляющих интерес агентов или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV). Мышей дикого типа также включали в исследуемую группу для контроля экспрессии транскрипта *Htt* в начальных условиях. Дизайн исследования обобщен в Таблице ниже.

Идентификатор группы	Обработка	Тестируемый препарат, ICV	Генотип	Размер группы (n) для 10 мес.	Размер группы (n) для 12 мес.	Мишень
1	Si-контроль	ИСМЖ	Q175 WT	n=3	n=4	Контроль

2	Si- контроль	ИСМЖ	Q175 HET	n=6	n=5	Контроль
3	Si1	AD-1271085	Q175 HET	n=4	n=10	HTT-FL
4	Si2	AD-1498524	Q175 HET	n=5	n=10	HTT-Ex1
5	Si3	AD-1019448	Q175 HET	n=5		HTT-Ex1

Через 1 месяц или 3 месяца после введения дозы (мыши в возрасте 10 или 12 месяцев, соответственно) у мышей собирали ткани, включая образцы ткани спинного мозга и стриатума. Один образец спинного мозга и один образец стриатума от каждой мыши использовали для анализа уровней РНК вариантного *Htt* QuantiGene. В качестве референсных контролей для анализов QuantiGene использовали мышей ДТ, получавших Si-контроль.

Панель QuantiGene для оценки транскрипта *Htt* представлена в Таблице ниже. Уровни экспрессии *Atp5b*, *Eif4a2* и *Gapdh* служили в качестве референсных генных контролей. Схема части транскрипта *Htt*, оцененного с помощью каждого анализа панели QuantiGene, отображена на Фигуре 7.

Обозначение мишени	Название	Доступ в GenBank
Htt-I1-pA1	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 с полиА-сайтом 1 (вариант с 680 п. о.)	
Htt-I1-pA2	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 с полиА-сайтом 2 (вариант с 1145 п. о.)	
Htt-I1-3'	Htt (мышинный эндогенный), интрон 1 на его 3'-конце	
Htt-I3	Htt (мышинный эндогенный), интрон 3	
Htt-FL-(экзоны 50-53)	Хантингтин, полноразмерный (общий)	NM_010414
Atp5b	АТФ-синтаза, H ⁺ транспортирующий митохондриальный комплекс F1, бета-субъединица	NM_016774
Eif4a2	Эукариотический фактор инициации трансляции 4A2	NM_013506
Gapdh	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	NM_001289726

На Фигурах 12А-12J отображены результаты анализа QuantiGene.

Как показано на Фигурах 12А, 12В, 12F и 12G, у мышей Q175 HET, получавших Si-

контроль, наблюдали значительно более высокую экспрессию НТТ, содержащего интронную последовательность (используя Htt-I1-pA1 и Htt-I1-pA2), по сравнению с мышами ДТ, получавшими Si-контроль, что подтверждало наличие фрагмента мутантного НТТ, созданного с помощью вставки распространившегося повтора CAG, у гетерозиготных животных. Этот эффект наблюдали в тканях спинного мозга и стриатума и в обеих конечных точках (в возрасте 10 месяцев и 12 месяцев). И наоборот, экспрессия полноразмерного *Htt* (используя Htt-FL-(экзоны 50-53)) была выше у мышей ДТ, получавших Si-контроль, в обеих тканях и в обеих конечных точках (Фигуры 12Е и 12J).

Тестируемые агенты продемонстрировали переменные тенденции к снижению как экспрессии транскриптов, детектированной с помощью зондов интронного/сплайс-варианта (Htt-I1-pA1 и Htt-I1-pA2), так и экспрессии транскриптов полноразмерного НТТ, в частности, введение AD-1498524 приводило к выраженному эффекту в 12-месячной (3-месячной после введения дозы) когорте.

Все агенты демонстрировали уменьшающийся эффект в отношении экспрессии транскрипта полноразмерного НТТ (Htt-FL-(экзоны_50-53) относительно Q175 НЕТ, получавших Si-контроль, в обеих тканях и обеих возрастных когортах. Это приводило к еще большему снижению полноразмерной формы по сравнению с животными ДТ.

Статистически значимые эффекты, наблюдаемые при некоторых сравнениях для Htt-I1-3' (представляющего последовательности интрона 1 после неполного сплайсинга, которые не заканчивались на криптоических сигналах полиА), могут указывать на некоторые эффекты агентов. Однако уровни общей флуоресценции и нормированной экспрессии (по сравнению с другими мишенями) Htt-I1-3' в целом являются низкими, что позволяет предположить, что низкие уровни этой мишени могут быть не очень биологически значимыми.

Дополнительные образцы ткани (54 образца ткани правой коры головного мозга и 54 образца ткани спинного мозга), которые собирали у мышей Q175DN, которым вводили однократную дозу 300 мкг представляющих интерес дуплексов, нацеленных на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085) или экзон 1 человеческого НТТ (AD-1498524 или AD-1019448), или контрольную искусственную СМЖ (ИСМЖ) путем интрацеребровентрикулярной инъекции (ICV), через 1 месяц и 3 месяца после инъекции подвергали анализу Meso Scale Discovery (MSD) для определения уровней мутантного белка НТТ, белка НТТ дикого типа и общего белка НТТ.

Все образцы тканей коры головного мозга и спинного мозга гомогенизировали в соответствии со стандартными процедурами. Образцы коры головного мозга гомогенизировали в 300 мкл лизирующего буфера MSD 1 в 2 мл пробирках с лизирующим матриксом D от MP biomedical (№ по каталогу 6913). Образцы спинного мозга гомогенизировали в 250 мкл лизирующего буфера MSD 1 в 2 мл пробирках с лизирующим матриксом Z от MP biomedical (№ по каталогу 6961). Ткань переносили в пробирки для гомогенизации тканей, содержащие лизирующий буфер MSD 1. Ткань гомогенизировали в течение трех раундов по 30 секунд при 6 м/с (кора) или 6,5 м/с (спинной мозг) с

применением высокоскоростного настольного гомогенизатора FastPrep-24. Пробирки центрифугировали в течение 20 минут при 20800 g при 4°C. Надосадочную жидкость переносили в 1,5-мл пробирки Eppendorf и повторно центрифугировали в течение 20 минут при 20800 g при 4°C. Лизаты аликвотировали и хранили при -80°C для последующего определения белка и анализа MSD.

Анализ БСА выполняли для определения общей концентрации белка во всех образцах. Результаты анализа БСА из каждого отдельного образца использовали после анализа MSD, во время анализа данных, для корректировки фактического количества загруженного белка.

Результаты анализа MSD для определения мутантного HTT и общего HTT представлены в Таблице ниже. Все образцы коры головного мозга и спинного мозга загружали на покрытые/заблокированные планшеты MSD и тестировали с техническими повторами между планшетами. После последовательных инкубаций с антителами для детектирования и стрептавидином-SulfoTag (MSD) планшеты считывали с помощью сканера изображений MSD S600. Для расчета концентраций HTT из стандартных кривых использовали программное обеспечение MSD. Концентрации загруженного белка использовали для обратного расчета фмоль/мг общего белка HTT

Анализ MSD	Концентрация антитела (захват/детектирование; мкг/мл)	Загруженный белок (мкг/лунку)		Стандартный референсный белок	Стандартный референсный диапазон концентраций (5-кратный ряд)
		Кора головного мозга	Спинной мозг		
Человеческий HTT с распространившимся полиQ-трактом (мутантный HTT (mHTT))	1,5/0,625	2	1	HTT-Q73 (1-3144)	0,05-4000 пМ
Общий (с распространившимся повтором и ДТ) мышиный HTT	8,0/0,4	10	10	HTT-Q7 (1-3120)	0,05-4000 пМ

Результаты анализа MSD для детектирования мутантного HTT и общего белка HTT

в образцах коры головного мозга отображены на Фигуре 12K, и результаты анализа MSD для детектирования мутантного белка НТТ и общего белка НТТ в образце спинного мозга отображены на Фигуре 12L.

Как отображено на Фигуре 12K, уровни мутантного НТТ были значительно снижены у мышей Q175 НЕТ, получавших агенты (AD-1271085, AD-1498524 или AD-1019448), по сравнению с группой Q175 НЕТ Si-контроль. Как и ожидалось, мутантный НТТ не детектировался ни в одном из образцов ДТ. Аналогичным образом, уровни общего мышинового НТТ были значительно снижены у мышей Q175 НЕТ, получавших агенты (AD-1271085, AD-1498524 или AD-1019448), по сравнению с группой Q175 НЕТ Si-контроль. Уровни общего мышинового НТТ в группе ДТ были приблизительно в два раза выше, чем в группе Q175 НЕТ, как и ожидалось. Не наблюдали статистических различий между 10- и 12-месячными конечными точками в уровнях мутантного НТТ или общего мышинового НТТ (двухсторонний непарный t-критерий), за исключением уровня мутантного НТТ (**) и общего мышинового НТТ (*) в группах Q175 НЕТ Si-контроль.

Сходные результаты были показаны в ткани спинного мозга. Как отображено на Фигуре 12L, уровни мутантного НТТ были значительно снижены у мышей Q175 НЕТ, получавших агенты (AD-1271085, AD-1498524 или AD-1019448), по сравнению с группой Q175 НЕТ Si-контроль. Как и ожидалось, мутантный НТТ не детектировался ни в одном из образцов ДТ. Уровни общего мышинового НТТ были значительно снижены у мышей Q175 НЕТ, получавших агенты (AD-1271085, AD-1498524 или AD-1019448), по сравнению с группой Q175 НЕТ Si-контроль. Уровни общего мышинового НТТ в группе ДТ были приблизительно в два раза выше, чем в группе Q175 НЕТ. Не наблюдали статистических различий между 10- и 12-месячными конечными точками по уровням мутантного НТТ или общего мышинового НТТ (двухсторонний непарный t-критерий), за исключением уровней mНТТ (****) в группах Q175 НЕТ AD-1498524.

Таким образом, все протестированные дуплексы показали значительное снижение уровней мутантного НТТ и общего мышинового белка НТТ по сравнению с группой Si-контроль. В частности, наиболее сильное ингибирование как уровней мутантного НТТ, так и уровней общего белка НТТ наблюдали после введения AD-1271085 или AD-1498524, и далее AD-1019448.

В заключение, эти данные дополнительно демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК мутантного НТТ и мутантного белка НТТ *in vivo*.

Пример 9. Нокдаун белка НТТ *in vivo* с использованием агентов РНКи, нацеленных на полноразмерный НТТ

Оценивали способность представляющих интерес дуплексов, нацеленных на полноразмерный человеческий НТТ (AD-1271085), вводимый приматам, отличным от человека, в низкой дозе (например, 3 мг и 10 мг) обеспечивать нокдаун транскрипта НТТ дикого типа и белка НТТ в различных нейрональных тканях.

В частности, самкам приматов, отличных от человека, интратекально вводили

однократную дозу 3 мг или однократную дозу 10 мг в объеме 2 мл AD-1271085 (n=8) в течение приблизительно 3 минут с помощью болюса вручную с последующей промывкой 0,3 мл искусственной СМЖ (ИСМЖ) или искусственную ИСМЖ (n=3) в День 1. В День 33 после введения дозы животных умерщвляли, перфузировали физиологическим раствором и собирали ткани. Ткани быстро замораживали для анализа Meso Scale Discovery (MSD). Собранные ткани включали префронтальную кору головного мозга, гиппокамп, путамен стриатума, хвостатое ядро стриатума и отдел позвоночника L1-L3 (поясничный отдел позвоночника). Схема эксперимента представлена в Таблице ниже:

Группа №	Тестируемый материал	Уровень дозы (мг/дозу)	Объем дозы (мл/дозу)	Концентрация дозы (мг/мл)	Число субъектов женского пола в основном исследовании
1	ИСМЖ	0	2	0	3
2	AD-1271085	3	2	1.5	8
3	AD-1271085	10	2	5	8

Как отображено на Фигуре 13А, введение дозы 3 мг AD-1271085 приводило к снижению уровней транскрипта НТТ в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе примерно на 55%. Введение дозы 10 мг AD-1271085 приводило к снижению уровней транскрипта НТТ примерно на 70% в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе и уменьшению примерно на 20% в хвостатом ядре стриатума. Уровни транскрипта НТТ в образцах префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума и хвостатого ядра стриатума для каждого животного при каждой дозе показаны на Фигуре 13В.

После подавления транскрипта НТТ уровень белка НТТ также снижался (Фигура 13С). У животных, которым вводили дозу 3 мг AD-1271085, в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе наблюдали ингибирование примерно на 65%, и в хвостатом ядре стриатума наблюдали ингибирование примерно на 40-50%. Введение дозы 10 мг AD-1271085 приводило к снижению уровней белка НТТ примерно на 80% в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе и потере примерно 50-60% в хвостатом ядре стриатума. Уровни белка НТТ в образцах префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, путамена стриатума и хвостатого ядра стриатума для каждого животного при каждой дозе показаны на Фигуре 13D.

На Фигуре 13Е отображена корреляция эффекта AD-1271085 со снижением уровня транскрипта и белка НТТ в образцах ткани префронтальной коры головного мозга, гиппокампа, хвостатого ядра стриатума, путамена стриатума, поясничного отдела позвоночника.

Кроме того, гистопатологический анализ окрашенных H&E и IBA-1 срезов коры головного мозга или гиппокампа из исследованных головных мозгов и спинных мозгов в

День 33 терминального умерщвления продемонстрировал отсутствие микроскопических признаков AD-1271085-связанного некроза нейрональных/глиальных клеток после введения 3 мг/кг или 10 мг/дозу.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что примерный дуплексный агент, AD-1271085, эффективно снижал уровень транскрипта и белка НТТ *in vivo*, даже при более низкой дозе 3 мг и 10 мг.

Пример 10. Нокдаун белка НТТ *in vivo* с использованием агентов РНКи, нацеленных на экзон 1 НТТ

Оценивали способность отобранных дуплексов, представляющих интерес, нацеленных на экзон 1 человеческого НТТ (AD-1498524, AD-1498526 и AD-1498528), обеспечивать нокдаун транскрипта НТТ дикого типа и белка НТТ в различных нейрональных тканях приматов, отличных от человека. В частности, самкам приматов, отличных от человека, интратекально вводили однократную дозу 60 мг в объеме 2 мл агентов (n=5) в течение приблизительно 3 минут с помощью болюса вручную с последующей промывкой 0,3 мл искусственной СМЖ (ИСМЖ) или искусственную ИСМЖ (n=3) в День 1. В День 59 после введения дозы животных умерщвляли, перфузировали физиологическим раствором и собирали ткани. Собранные ткани включали префронтальную кору головного мозга, гиппокамп, путамен стриатума, хвостатое ядро стриатума и поясничный отдел позвоночника. Уровни транскриптов определяли с помощью анализа методом ОТ-ПЦР, и уровни белка определяли количественно с помощью жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ЖХ/МС).

Схема эксперимента представлена в Таблице ниже:

Группа №	Тестируемый материал	Уровень дозы (мг/дозу)	Объем дозы (мл/дозу)	Концентрация дозы (мг/мл)	Число субъектов женского пола в основном исследовании
1	ИСМЖ	0	2	0	5
2	AD-1498524	60	2	30	5
3	AD-1498526	60	2	30	5
4	AD-1498526	60	2	30	5

Как отображено на Фигуре 14А, уровень белка НТТ снижался после введения тестируемых агентов. У животных, которым вводили AD-1498524, в частности, в тканях префронтальной коры головного мозга и хвостатого ядра стриатума, наблюдали значительное ингибирование. Подобные ингибирующие эффекты наблюдали в отношении уровня транскрипта для всех протестированных агентов, и у животных, которым вводили AD-1498524, наблюдали наиболее значительное снижение уровней транскрипта НТТ в образцах всех тканей (Фигура 14В). Уровни мРНК НТТ в образце каждой ткани также

отображены на Фигуре 14C. На Фигуре 14D показана корреляция эффекта ингибирования с уровнем транскрипта и белка НТТ в образцах тканей.

Эти данные дополнительно демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты эффективно снижают уровень матричной РНК НТТ и белка НТТ *in vivo*.

Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против экзона 1 НТТ

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_002111.8	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_002111.8
AD-1498532	CUUCGAGUCCCUCAAGUCA	35	175-193	UGACTUGAGGGACUCGAAGGC	47	173-193
AD-1019465	CCAUGGCGACCCUGGAAAAGA	28	144-164	UCUUUUC CAGGGUCGCCAUGGCG	32	142-164
AD-1498529	ACCCUGGAAAAGCUGAUGAAA	36	152-172	UUUCAUCAGCUUUUCCAGGGUCG	48	150-172
AD-1498531	CCUGGAAAAGCUGAUGAAA	37	154-172	UUUCAUCAGCUUUUCCAGGGU	49	152-172
AD-1019476	CUGAUGAAGGCCUUCGAGUCA	38	164-184	UGACUCGAAGGCCUUCAUCAGCU	50	162-184
AD-1443079	CUGAAGAAGGCCUUCGAGUCA	39	164-184	UGACTCGAAGGCCUUCUUCAGCU	51	162-184
AD-1443080	GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCA	52	147-169
AD-1498521	GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG	53	147-169

AD- 1498522	UCCCUCAAGUCCUCCAGCAA	41	182-202	UUGCUGGAAGGACUUGAGGGACU	54	180-202
AD- 1498523	UCCCACAAGUCCUCCAGCAA	42	182-202	UUGCTGGAAGGACUUGUGGGACU	55	180-202
AD- 1498524	GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA	40	149-169	UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG	53	147-169
AD- 1498525	UCAGGUUCUGCUUUUACCA	43	33-51	UGGUAAAAGCAGAACCUGAGC	56	31-51
AD- 1498526	CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA	44	175-195	UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC	57	173-195
AD- 1498527	GCCGCUCAGGUUCUGCUUUUA	45	28-48	UAAAAGCAGAACCUGAGCGGCCG	58	26-48
AD- 1498528	CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA	46	29-49	UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC	59	27-49
AD- 1019448	CCAGAGCCCCAUUCAUUGCCA	97	57-77	UGGCAAUGAAUGGGGCUCUGGGC	98	55-77

Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК против экзона 1 НТТ

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO:
AD-1498532	csusu(Chd)GfaGfUfCfccucaaguscsa	60	VPusdGsacdTu(G2p)agggacUfcGfaagsgsc	73	GCCUUCGAGUCCCUC AAGUCC	
AD-1019465	cscsaug(Ghd)CfgAfCfCfcuggaaaasgsa	33	VPusCfsuuuUfcCfAfggggUfcCfcauggscsg	34	CGCCAUGGCGACCCU GGAAAAGC	
AD-1498529	ascscu(Ghd)GfaAfAfAfgcugaugasasa	61	VPusUfsucau(C2p)agcuuuUfcCfaggguscsg	74	CGACCCUGGAAAAGC UGAUGAAG	
AD-1498531	cscsuggaAfAfAfgcuga(Uhd)gasasa	62	VPusUfsucdAu(C2p)agcuuuUfcCfaggsgsu	75	ACCCUGGAAAAGCU GAUGAAG	
AD-1019476	csusgau(Ghd)AfaGfGfCfcuucgaguscsa	63	VPusGfsacuCfgAfAfggccUfuCfaucagscsu	76	AGCUGAUGAAGGCC UUCGAGUCC	
AD-1443079	csusga(Ahd)gAfaGfGfCfcuucgaguscsa	64	VPusdGsacdTc(G2p)aaggccUfuCfuucagscsu	77	AGCUGAUGAAGGCC UUCGAGUCC	
AD-1443080	gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa	65	VPusAfsucag(C2p)uuuuccAfgGfgucgcscsa	78	UGGCGACCCUGGAA AAGCUGAUG	
AD-1498521	gscsgac(Chd)CfudGgAfaaagcugasusa	66	VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg	79	UGGCGACCCUGGAA AAGCUGAUG	

AD-1498522	uscscu(Chd)AfaGfUfCfcuuccagsasa	67	VPusUfsgcug(G2p)aaggacUfuGfagggascsu	80	AGUCCCUCAAGUCCU UCCAGCAG	
AD-1498523	uscscu(Chd)AfaGfUfCfcuuccagsasa	68	VPusUfsgcdTg(G2p)aaggacUfudGugggascsu	81	AGUCCCUCAAGUCCU UCCAGCAG	
AD-1498524	gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa	65	VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgscsg	79	UGGCGACCCUGGAA AAGCUGAUG	
AD-1498525	uscsgguUfCfUfgcuu(Uhd)uacscsa	69	VPusdGsgudAa(A2p)agcagaAfcCfugasgsc	82	GCUCAGGUUCUGCU UUUACCU	
AD-1498526	csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa	70	VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcaagsgsc	83	GCCUUCGAGUCCCUC AAGUCCUU	
AD-1498527	gscscgc(Uhd)CfadGgUfucugcuuususa	71	VPusAfsaadAg(C2p)agaadCcUfgAfgcgscsg	84	CGGCCGCUCAGGUUC UGCuuuUA	
AD-1498528	cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuusasa	72	VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc	85	GGCCGCUCAGGUUCU GCUUUUAC	
AD-1019448	cscsaga(Ghd)CfcCfCfAfucauugcscsa	99	VPusGfsgcaAfuGfAfauggGfgCfucuggsgsc	100	GCCCAGAGCCCCAUU CAUUGCCC	

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантинтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная антисмысловая цепь содержит область комплементарности мРНК, кодирующей НТТ, и при этом указанная область комплементарности содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5, за исключением дуплексов AD-1019465 и AD-1019476.

2. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантинтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 26-77; или 142-202 из SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

3. Агент на основе дцРНК по п. 2, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 27-49; 147-169; или 173-195 из SEQ ID NO:1.

4. Агент на основе дцРНК по п. 3, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 147-169 из SEQ ID NO:1.

5. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1498524, AD-1498526 или AD-1498528.

6. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1498524.

7. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантинтина (НТТ) в клетке, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 4391-4669; или 6009-6037 из SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из

соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:6.

8. Агент на основе дцРНК по п. 2, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности нуклеотидов 4398-4420; 4403-4425; или 6512-6534 из SEQ ID NO:1.

9. Агент на основе дцРНК по п. 8, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 4398-4420 из SEQ ID NO:1.

10. Агент на основе дцРНК по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1271085, AD-1271083 или AD-1271084.

11. Агент на основе дцРНК по п. 10, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидной последовательности антисмысловой цепи AD-1271085.

12. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

13. Агент на основе дцРНК по п. 12, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области указанного агента на основе дцРНК.

14. Агент на основе дцРНК по п. 12 или 13, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями в указанной антисмысловой цепи.

15. Агент на основе дцРНК по п. 12 или 13, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи посредством линкера или носителя.

16. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-15, отличающийся тем, что липофильность указанного липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, превышает 0.

17. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-16, отличающийся тем, что гидрофобность указанного агента на основе дцРНК, измеренная на основании несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови указанного агента на основе дцРНК, превышает 0,2.

18. Агент на основе дцРНК по п. 17, отличающийся тем, что указанный анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

19. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 13-15, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца указанной смысловой цепи или указанной антисмысловой цепи.

20. Агент на основе дцРНК по п. 19, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца указанной смысловой цепи или указанной антисмысловой цепи.

21. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 13-20, отличающийся тем, что указанные внутренние положения исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

22. Агент на основе дцРНК по п. 21, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением положений 9-12, отсчитывая от 5'-конца указанной смысловой цепи.

23. Агент на основе дцРНК по п. 21, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13, отсчитывая от 3'-конца указанной смысловой цепи.

24. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 13-20, отличающийся тем, что указанные внутренние положения исключают область сайта расщепления указанной антисмысловой цепи.

25. Агент на основе дцРНК по п. 24, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, отсчитывая от 5'-конца указанной антисмысловой цепи.

26. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 13-25, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 на указанной смысловой цепи, отсчитывая от 3'-конца, и положений 12-14 на указанной антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца.

27. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-26, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на указанной смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на указанной антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

28. Агент на основе дцРНК по п. 27, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на указанной смысловой цепи и положений 15 и 17 на указанной антисмысловой цепи, отсчитывая от 5'-конца каждой цепи.

29. Агент на основе дцРНК по п. 13, отличающийся тем, что указанные положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

30. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-29, отличающийся тем, что

указанная смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину, указанная антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину, и указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 указанной смысловой цепи или положением 16 указанной антисмысловой цепи.

31. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 21-30, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь представляет собой 21 нуклеотид в длину, указанная антисмысловая цепь представляет собой 23 нуклеотида в длину, и указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 указанной смысловой цепи или положением 16 указанной антисмысловой цепи.

32. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-31, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

33. Агент на основе дцРНК по п. 32, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеоил)лихолевой кислоты, О3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

34. Агент на основе дцРНК по п. 33, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

35. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

36. Агент на основе дцРНК по п. 35, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

37. Агент на основе дцРНК по п. 36, отличающийся тем, что указанная насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована в положении 6, отсчитывая от 5'-конца цепи.

38. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-37, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(положениях) или двухцепочечной области.

39. Агент на основе дцРНК по п. 38, отличающийся тем, что указанный носитель

представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на серинольном остове или диэтаноламиновом остове.

40. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-39, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным агентом на основе дцРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

41. Агент на основе двухцепочечной иРНК по любому из пп. 12-40, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

42. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-41, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

43. Агент на основе дцРНК по п. 42, отличающийся тем, что не более пяти нуклеотидов указанной смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов указанной антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

44. Агент на основе дцРНК по п. 43, отличающийся тем, что все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

45. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 42-44, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 2'-5'-связанного рибонуклеотида (3'-РНК), блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер

тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевой нуклеотида, связанного с производным холестерина, бисдециламидной группы додекановой кислоты; цитидин-2'-фосфата, гуанозин-2'-фосфата, уридин-2'-фосфата, аденозин-2'-фосфата, 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфата, 2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфата, 2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфата и 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфата, и их комбинаций.

46. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что указанный модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксидифтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидифтор-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), блокированного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

47. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидифтор-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций.

48. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из указанных модификаций на нуклеотидах представляет собой термически дестабилизирующую нуклеотидную модификацию.

49. Агент на основе дцРНК по п. 48, отличающийся тем, что указанная термически дестабилизирующая нуклеотидная модификация выбрана из группы, состоящей из модификации лишенным азотистого основания нуклеотидом; несовпадения с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксидифтор-модификации, ациклического нуклеотида, 2'-5'-связанного рибонуклеотида (3'-РНК), неблокированных нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

50. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

51. Агент на основе дцРНК по п. 45, отличающийся тем, что указанные модификации на нуклеотидах представляют собой 2'-О-метил, GNA и 2'-фтор-модификации.

52. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-51, дополнительно содержащий по меньшей мере одну фосфотиоатную межнауклеотидную связь.

53. Агент на основе дцРНК по п. 52, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнауклеотидных связей.

54. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-53, отличающийся тем, что каждая цепь представляет собой не более 30 нуклеотидов в длину.

55. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

56. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-54, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

57. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-56, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 15-30 нуклеотидных пар в длину.

58. Агент на основе дцРНК по п. 57, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 17-23 нуклеотидные пары в длину.

59. Агент на основе дцРНК по п. 57, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 17-25 нуклеотидных пар в длину.

60. Агент на основе дцРНК по п. 57, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 23-27 нуклеотидных пар в длину.

61. Агент на основе дцРНК по п. 57, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 19-21 нуклеотидную пару в длину.

62. Агент на основе дцРНК по п. 57, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область представляет собой 21-23 нуклеотидные пары в длину.

63. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что каждая цепь представляет собой 19-30 нуклеотидов в длину.

64. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что каждая цепь представляет собой 19-23 нуклеотида в длину.

65. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что каждая цепь представляет собой 21-23 нуклеотида в длину.

66. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-65, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

67. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 12-66, отличающийся тем, что указанный 3'-конец смысловой цепи защищен посредством концевого кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолидинила, пиразолидинила, имидазолидинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

68. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

69. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в S_p-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

70. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой, второй или третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в S_p-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

71. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в S_p-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

72. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

73. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-72, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце указанной антисмысловой цепи.

74. Агент на основе дцРНК по п. 73, отличающийся тем, что указанный миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

75. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-74, отличающийся тем, что указанная пара оснований в положении 1 5'-конца указанной антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

76. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-75, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и указанная антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

77. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

78. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-77, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCGACCCUGGAAAAGCUGAUA-3' (SEQ ID NO: 40), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UAUCAGCUUUUCCAGGGUCGCCG-3' (SEQ ID NO: 53).

79. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина

(НТТ) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, C, G и U; (Chd)

представляет собой 2'-О-гексадецилцитозин-3'-фосфат; C2p представляет собой цитидин-2'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

80. Агент на основе дцРНК по п. 79, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

81. Агент на основе дцРНК по п. 79 или п. 80, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

82. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 79-81, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

83. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 79-82, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

84. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 79-83, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsgac(Chd)CfuGfGfAfaaagcugasusa-3' (SEQ ID NO:65), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsucdAg(C2p)uuuudCcAfgdGgucgcscsg-3' (SEQ ID NO:79).

85. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3' (SEQ ID NO: 57).

86. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73 и 85, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUA-3' (SEQ ID NO: 44), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UAGGACTUGAGGGACUCGAAGGC-3'

(SEQ ID NO: 57).

87. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, C, G и U; (Ahd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; Tgn представляет собой S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA); и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

88. дцРНК по п. 87, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

89. дцРНК по п. 87 или 88, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

90. дцРНК по любому из пп. 87-89, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

91. дцРНК по любому из пп. 87-90, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3'

(SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

92. дцРНК по любому из пп. 87-91, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-csusucg(Ahd)GfuCfCfCfucaaguccsusa-3' (SEQ ID NO:70), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfsggac(Tgn)ugagggAfcUfcgaagsgsc-3' (SEQ ID NO:83).

93. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO: 59).

94. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76 и 93, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-CCGGUCAGGUUCUGCUUUUAA-3' (SEQ ID NO: 46), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UUAAAAGCAGAACCUGACCGGCC-3' (SEQ ID NO: 59).

95. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина (HTT) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-OMe) A, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U; (Chd) представляет собой 2'-О-гексадецилцитозин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

96. дцРНК по п. 95, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

97. дцРНК по п. 95 или 96, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем

2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

98. дцРНК по любому из пп. 95-97, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем

1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь

содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем

1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

99. дцРНК по любому из пп. 95-98, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

100. дцРНК по любому из пп. 95-98, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-cscsggu(Chd)AfgGfUfUfcugcuuuusasa-3' (SEQ ID NO:72), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusUfsaadAadGcagaacCfudGaccggscsc-3' (SEQ ID NO:85).

101. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16).

102. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76 и 101, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCUAUUCAUAAUCACAUUCGA-3' (SEQ ID NO: 15), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCGAAUGUGAUUAUGAAUAGCAU-3' (SEQ ID NO: 16).

103. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина

(НТТ) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, C и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, C, G и U; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

104. Агент на основе дцРНК по п. 103, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18).

105. Агент на основе дцРНК по п. 103 или 104, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18).

106. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 103-105, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18).

107. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 103-106, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18).

108. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 103-107, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsuau(Uhd)CfaUfAfAfucacauucsgsa-3' (SEQ ID NO:17), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsgaaUfgUfGfauuaUfgAfauagcsasu-3' (SEQ ID NO:18).

109. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UCAGGAAUCCGAUUCACCAGCUC-3' (SEQ ID NO: 30).

110. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76 и 109, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-GCUGGUGAAUCGGAUUCUGA-3' (SEQ ID NO: 26), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCAGGAAUCCGAUUCACCAGCUC-3' (SEQ ID NO: 30).

111. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для

ингибирования экспрессии хантингтина

(НТТ) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

112. Агент на основе дцРНК по п. 111, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22).

113. Агент на основе дцРНК по п. 111 или 112, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22).

114. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 111-113, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22).

115. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 111-114, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc-3' (SEQ ID NO:22).

116. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 111-115, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-gscsugg(Uhd)GfaAfUfCfsggauuccusgsa-3' (SEQ ID NO:21), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusCfsaggAfaUfCfcgauUfcAfccagcsusc u-3' (SEQ ID NO:22).

117. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5' - UACAAACGAAUGUGAUUAUGAAU-3' (SEQ ID NO: 29).

118. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-76 и 117, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UCAUAAUCACAUUCGUUUGUA-3' (SEQ ID NO: 25), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-UACAAACGAAUGUGAUUAUGAAU-3' (SEQ ID NO: 29).

119. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии хантингтина

(НТТ) в клетке,

причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 4 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20),

где а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, G, С и U; s представляет собой фосфотиоатную связь; Af, Cf, Gf, Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U; (Uhd) представляет собой 2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат; и VP представляет собой 5'-винилфосфонат.

120. Агент на основе дцРНК по п. 119, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20).

121. Агент на основе дцРНК по п. 119 или 120, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем

2 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20).

122. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 119-121, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20).

123. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 119-122, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20).

124. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 119-123, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-uscsaua(Ahd)UfcAfCfAfuucguuugsusa-3' (SEQ ID NO:19), и указанная антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности 5'-VPusAfscAAfCfGfAfauguGfaUfuaugasasu-3' (SEQ ID NO:20).

125. Клетка, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124.

126. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего НТТ, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124.

127. Фармацевтическая композиция, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 и липидный состав.

128. Композиция, содержащая два или более агентов на основе дцРНК для ингибирования экспрессии хантингтина (НТТ) в клетке,

причем каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем каждая из указанных антисмысловых цепей независимо содержит область комплементарности мРНК, кодирующей НТТ, и при этом каждая из указанных областей комплементарности независимо содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 2-5.

129. Способ ингибирования экспрессии гена хантингтина (НТТ) в клетке, причем указанный способ включает:

(а) приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 или композицией по п. 128, или фармацевтической композицией по п. 126 или 127; и

(b) поддержание указанной клетки, полученной на этапе (а), в течение времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена НТТ, что приводит к ингибированию

экспрессии гена НТТ в указанной клетке.

130. Способ по п. 129, отличающийся тем, что указанная клетка находится в организме субъекта.

131. Способ по п. 130, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

132. Способ по любому из пп. 129-131, отличающийся тем, что указанная экспрессия НТТ ингибируется по меньшей мере на 50%.

133. Способ по любому из пп. 129-132, отличающийся тем, что у указанного субъекта диагностировано связанное с НТТ заболевание.

134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что указанное заболевание, связанное с распространением нуклеотидного повтора, представляет собой болезнь Хантингтона.

135. Способ лечения субъекта, у которого диагностировано связанное с НТТ заболевание, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 или композиции по п. 128 или фармацевтической композиции по п. 126 или 127, что обеспечивает лечение указанного субъекта.

136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что осуществление лечения включает уменьшение по меньшей мере одного признака или симптома указанного заболевания.

137. Способ по п. 135, отличающийся тем, что осуществление лечения включает предотвращение прогрессирования указанного заболевания.

138. Способ по п. 135, отличающийся тем, что указанное связанное с НТТ заболевание представляет собой болезнь Хантингтона.

139. Способ по любому из пп. 135-138, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят указанному субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

140. Способ по любому из пп. 135-139, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят субъекту интратекально.

141. Способ по любому из пп. 135-140, дополнительно включающий измерение уровня НТТ в образце, полученном от указанного субъекта.

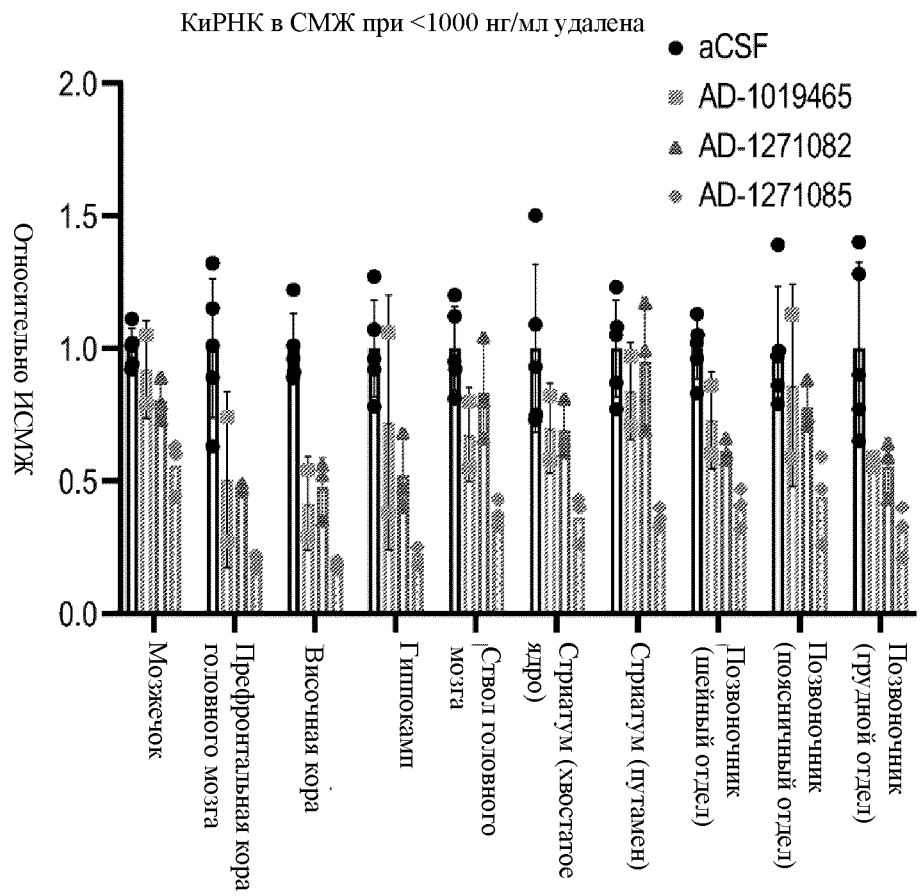
142. Способ по любому из пп. 135-141, дополнительно включающий введение указанному субъекту дополнительного агента, подходящего для лечения или предотвращения связанного с НТТ расстройства.

143. Набор, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 или композицию по п. 128, или фармацевтическую композицию по п. 126 или 127.

144. Флакон, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 или композицию по п. 128, или фармацевтическую композицию по п. 126 или 127.

145. Шприц, содержащий агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-124 или композицию по п. 128, или фармацевтическую композицию по п. 126 или 127.

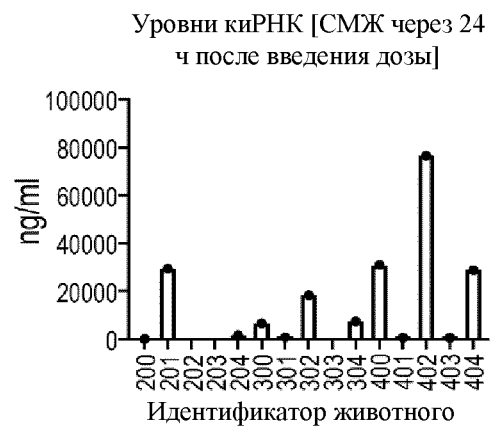
По доверенности



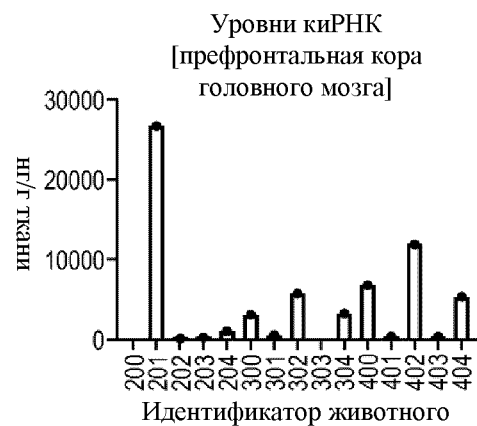
Фиг. 1

	Среднее значение	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ACSF	SD	0.08	0.26	0.13	0.18	0.16	0.31	0.18	0.11	0.24	0.33
	Среднее значение	0.86	0.63	0.44	0.77	0.78	0.76	0.80	0.74	0.87	0.57
AD-1019465	SD	0.16	0.32	0.13	0.35	0.22	0.16	0.15	0.13	0.27	0.02
	Среднее значение	0.80	0.47	0.48	0.52	0.83	0.69	0.95	0.61	0.78	0.55
AD-1271082	SD	0.08	0.02	0.11	0.14	0.19	0.10	0.24	0.04	0.09	0.11
	Среднее значение	0.56	0.20	0.18	0.23	0.38	0.36	0.36	0.40	0.44	0.31
AD-1271085	SD	0.10	0.02	0.01	0.04	0.05	0.09	0.04	0.07	0.17	0.10

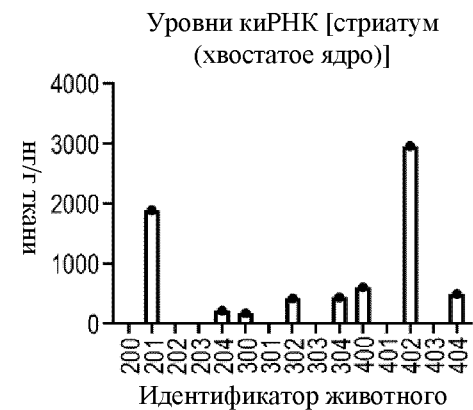
Фиг. 2



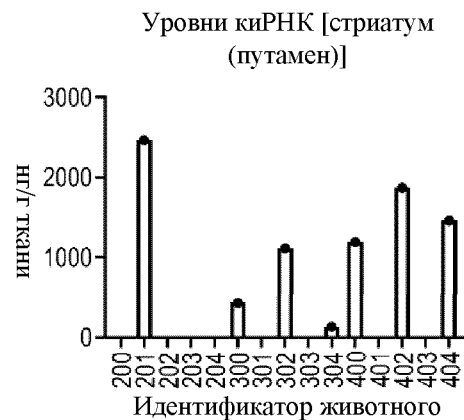
Фиг. 3А



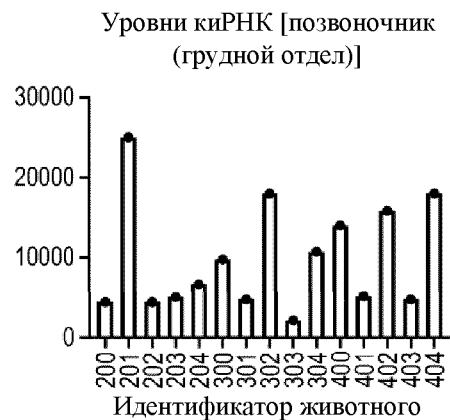
Фиг. 3В



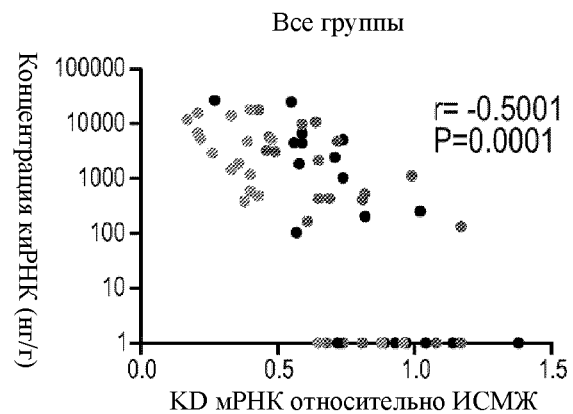
Фиг. 3С



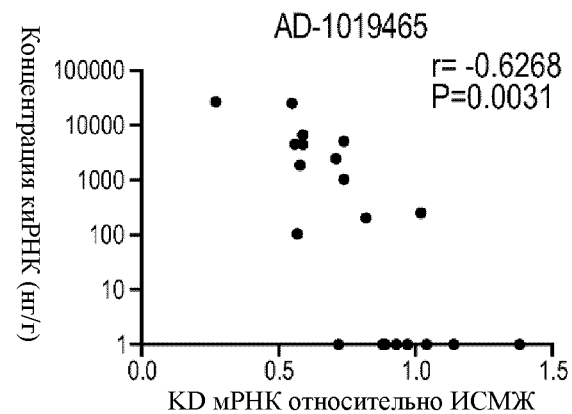
Фиг. 3D



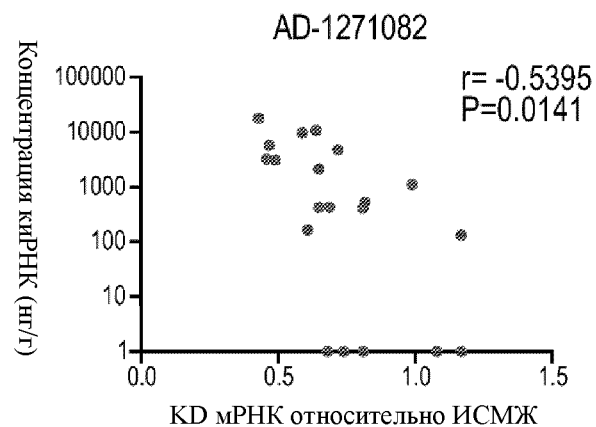
Фиг. 3Е



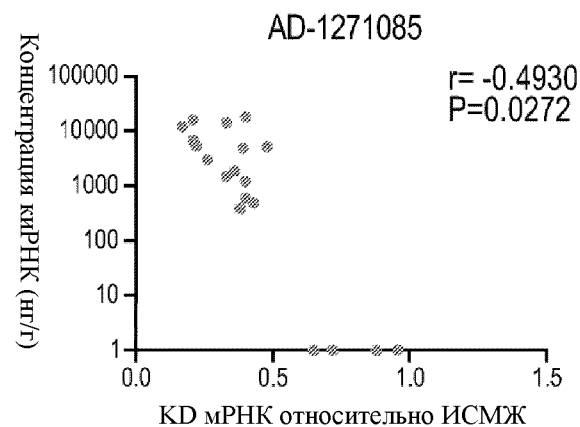
Фиг. 4А



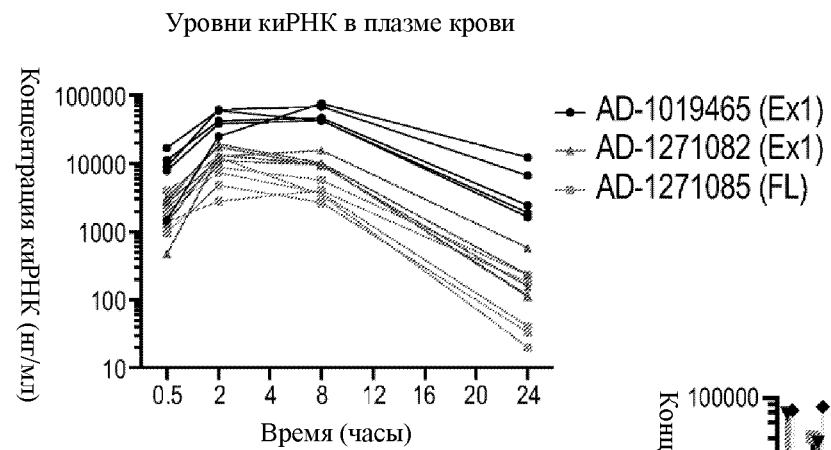
Фиг. 4В



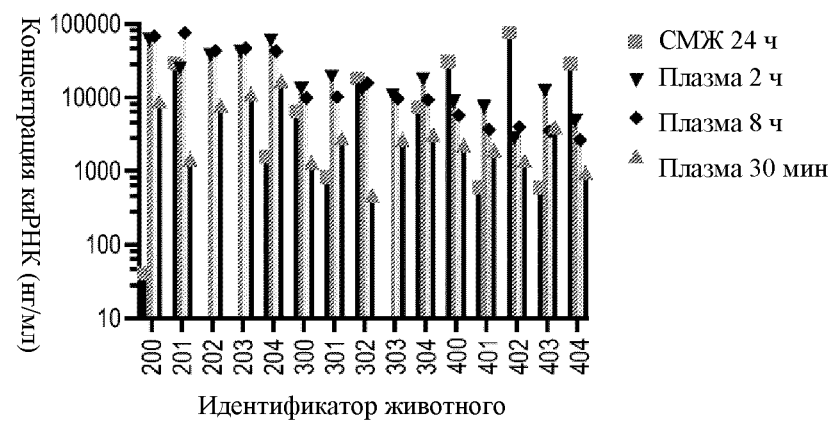
Фиг. 4С



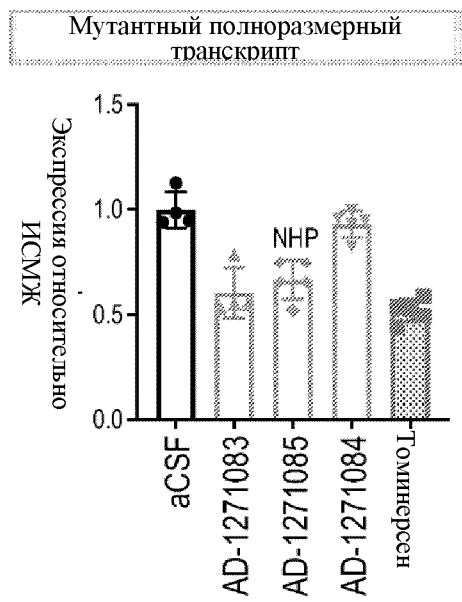
Фиг. 4Д



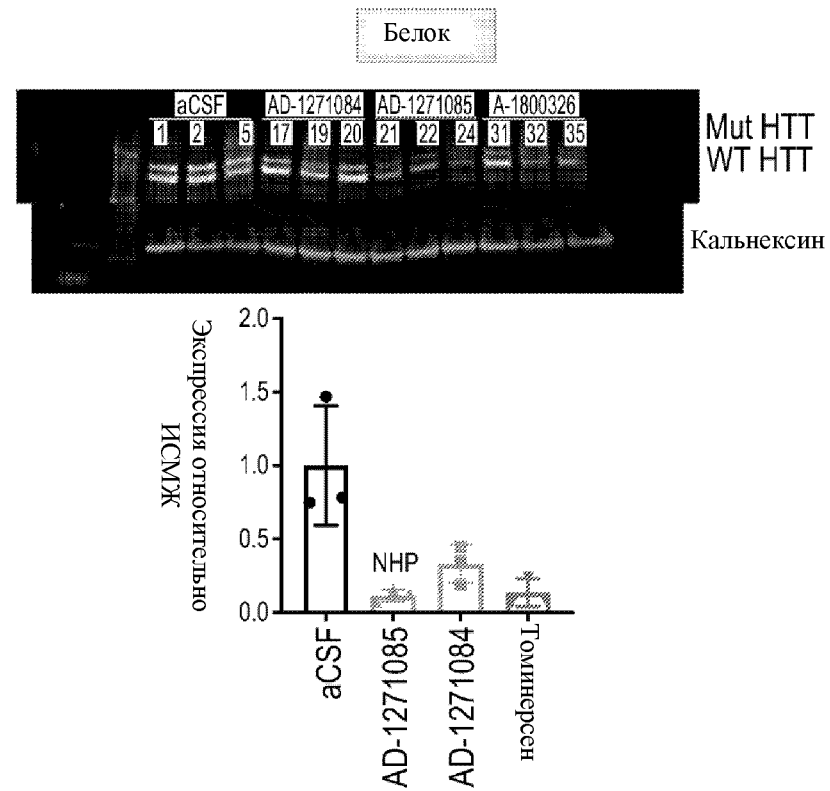
Фиг. 5А



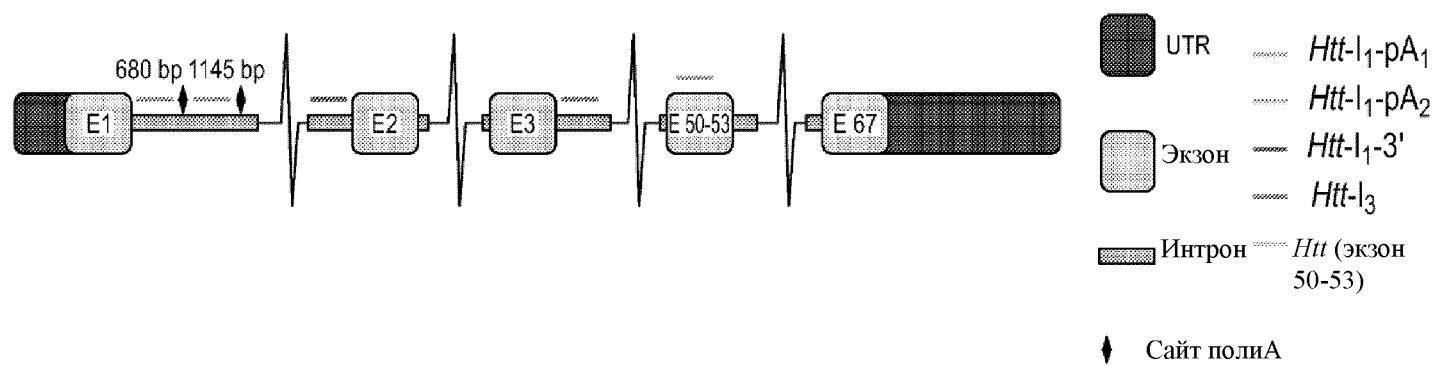
Фиг. 5В



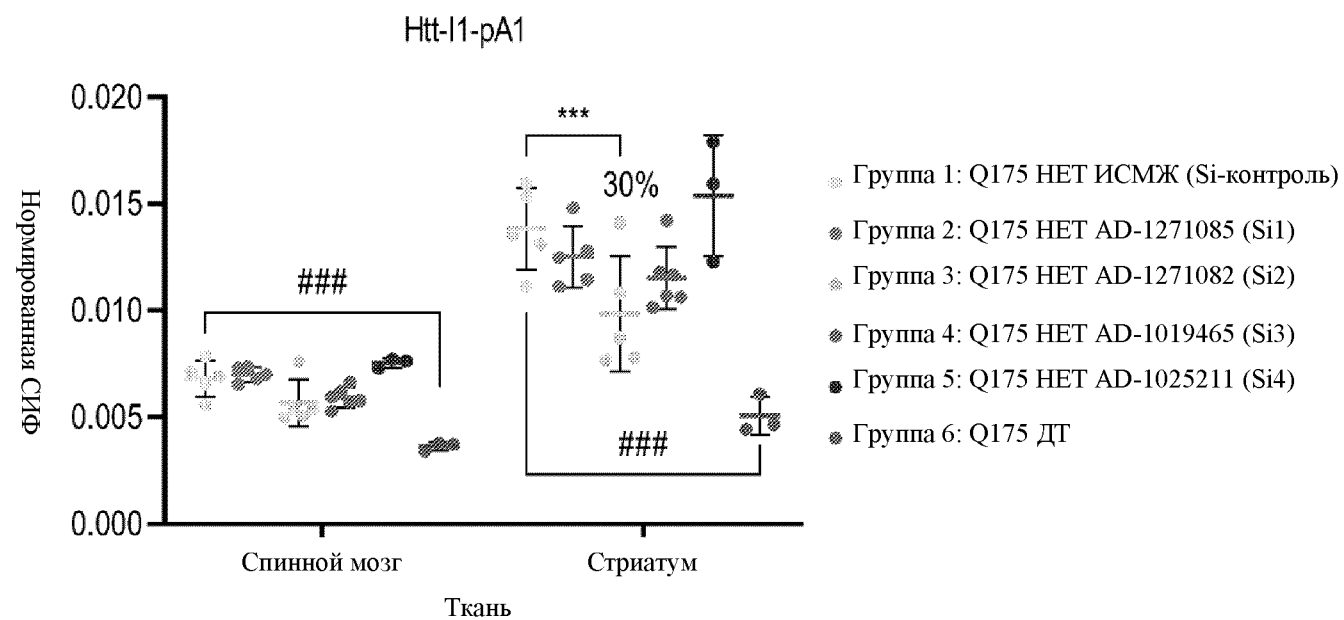
Фиг. 6А



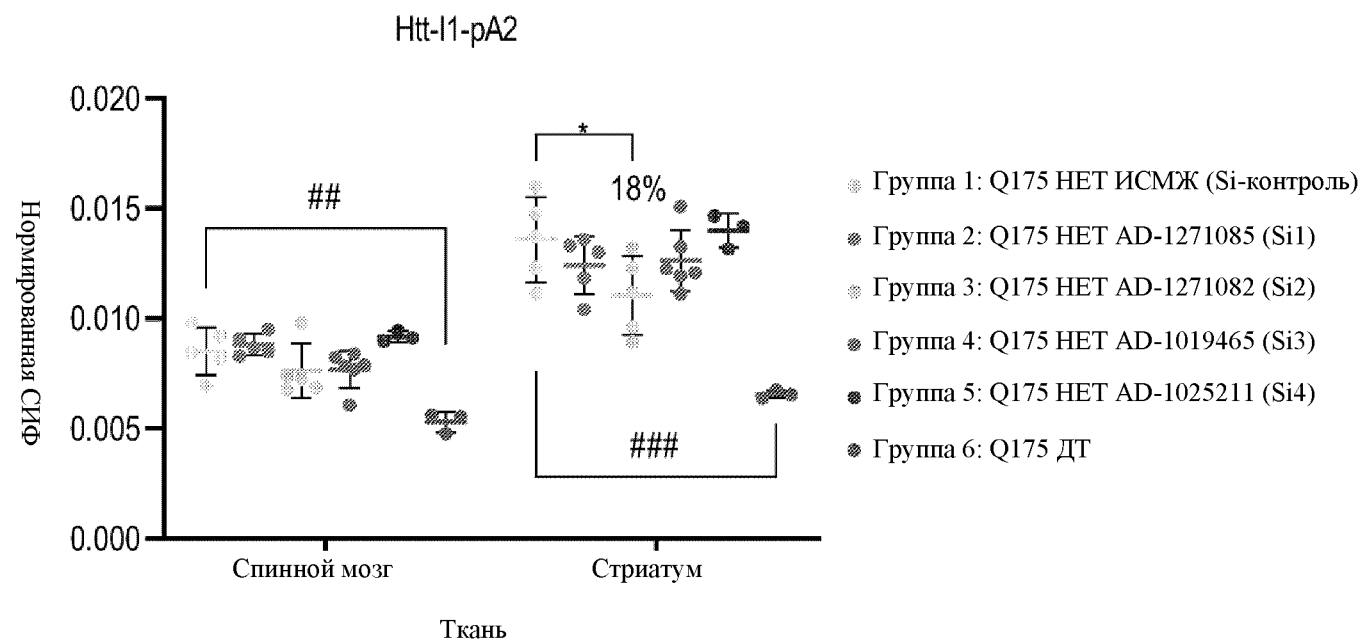
Фиг. 6В



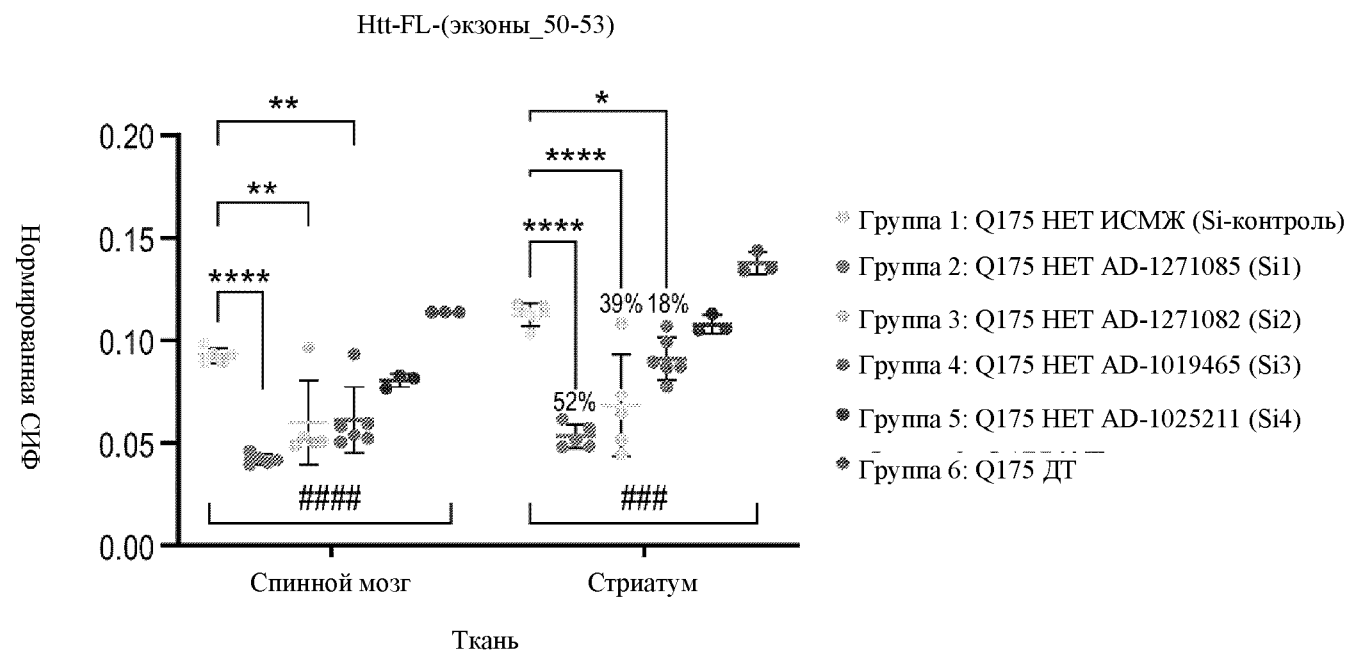
Фиг. 7



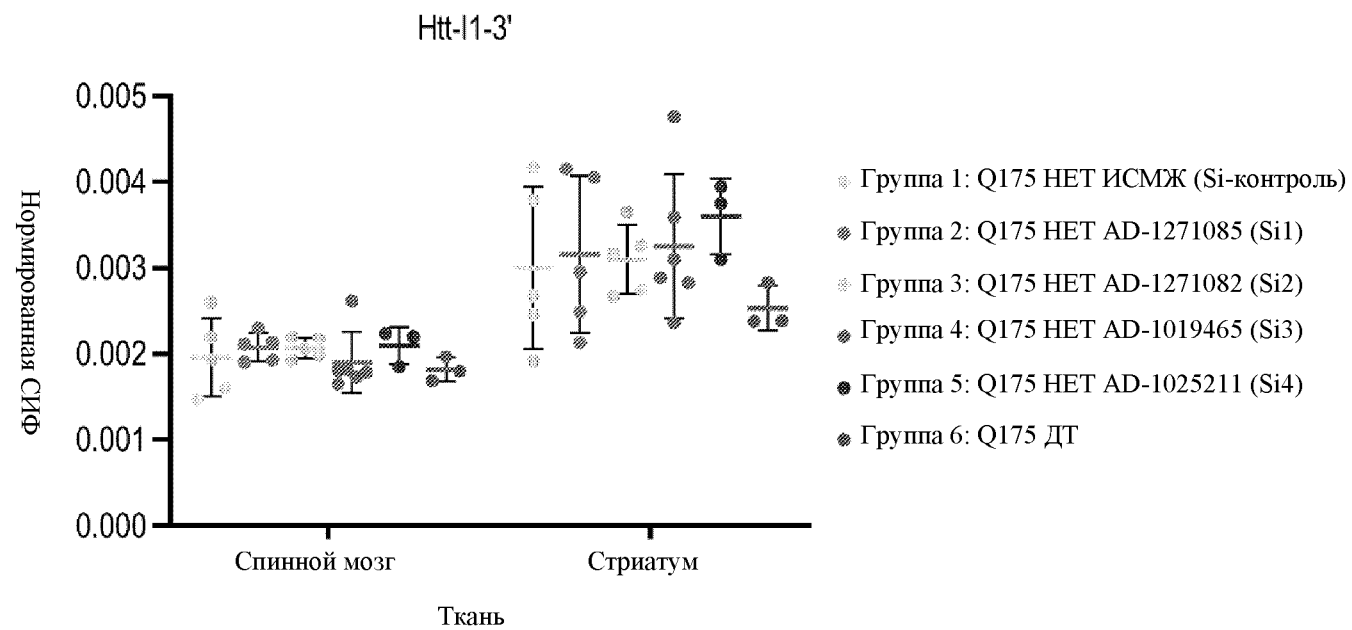
Фиг. 8А



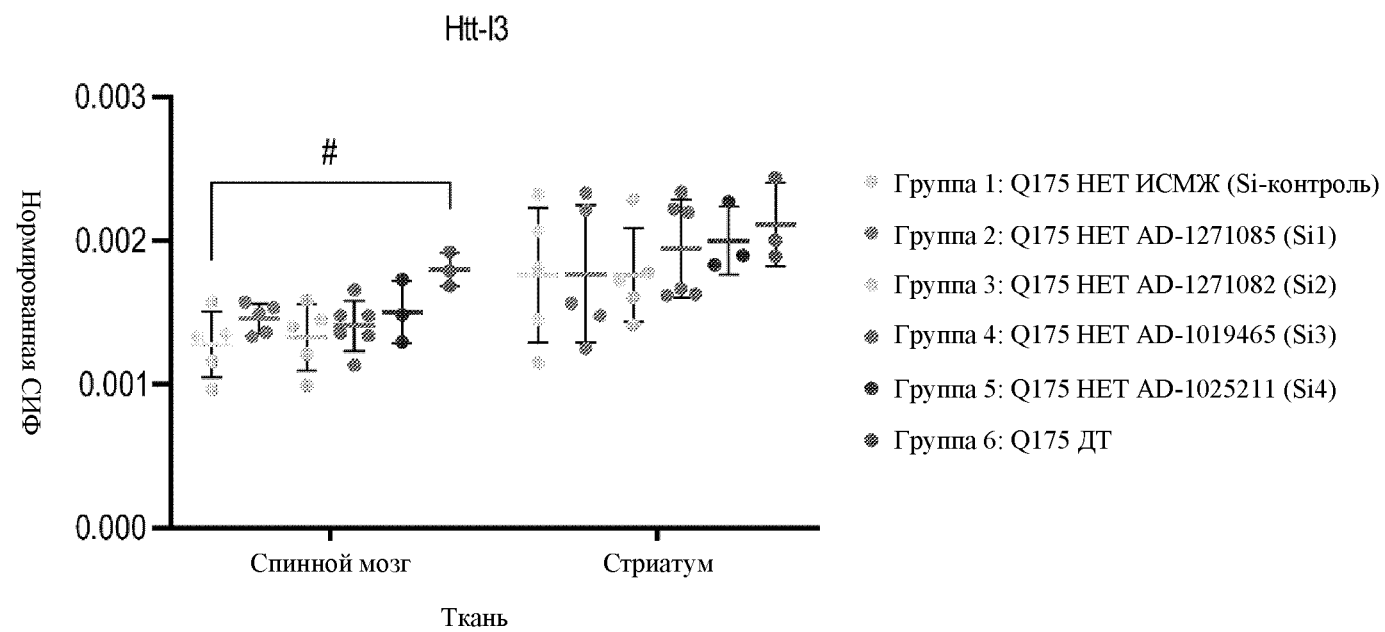
Фиг. 8B



Фиг. 8С



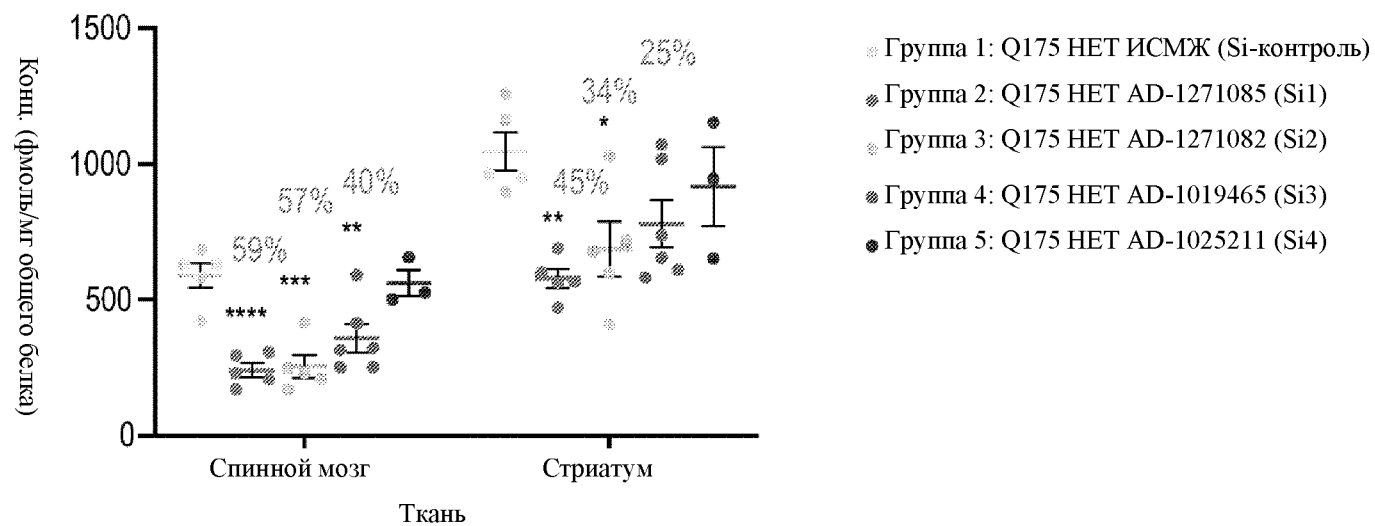
Фиг. 8D



Фиг. 8Е

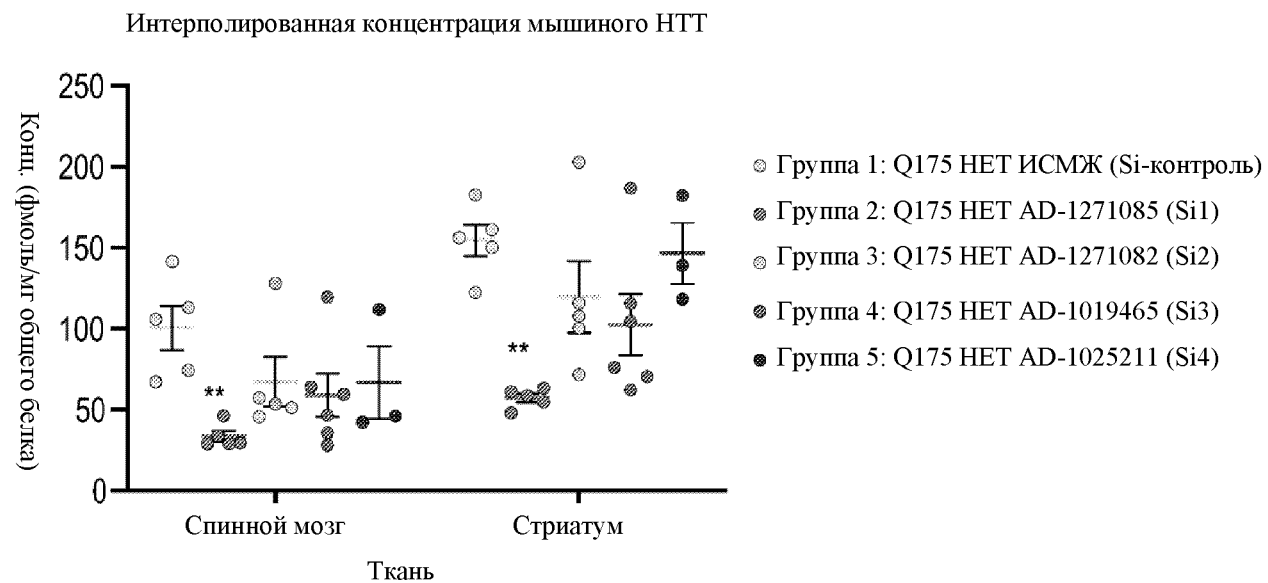
2B7 (домен N17 HTT)/MW1 (домен полиQ) Std-
HTT-Q73 (1-573)

Интерполированная концентрация HTT с
распространением

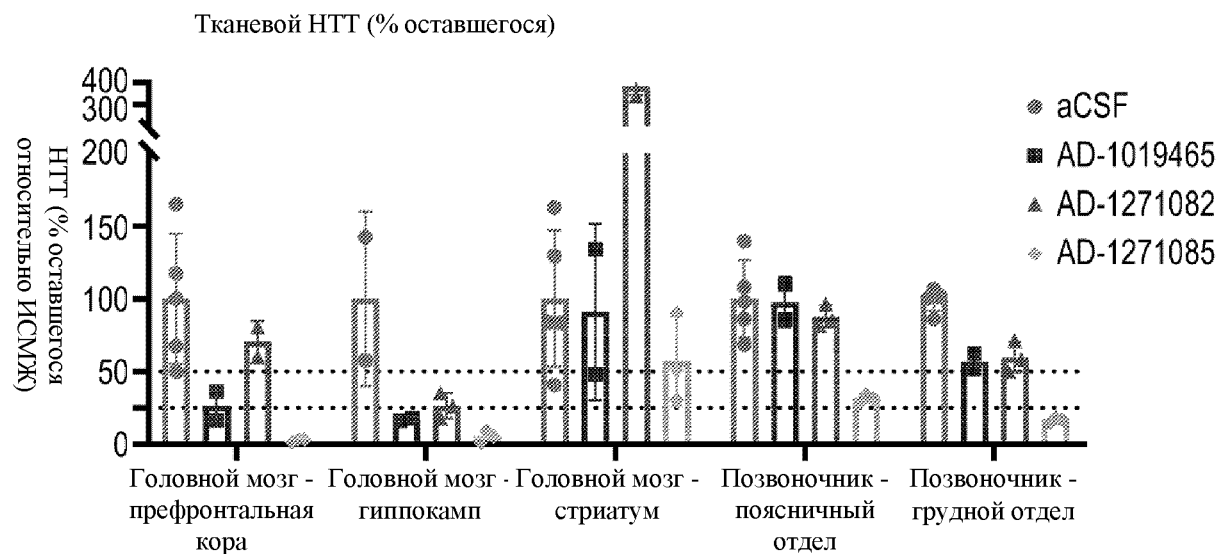


Фиг. 8F

CHDI90002133 (мышинная область, богатая пролином)/
D7F7 (остатки, окружающие Pro1220 человеческого HTT)
Std- HTT-Q7 (мышь, 1-3144)

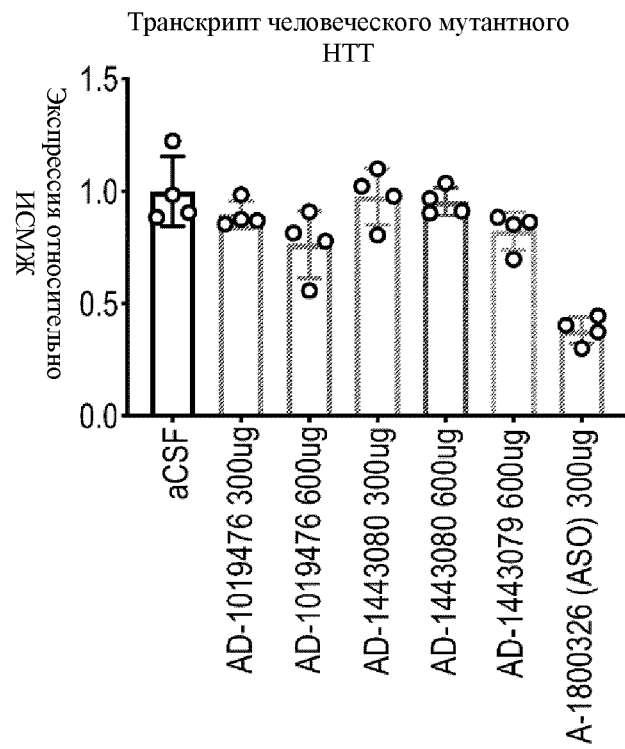


Фиг. 8G

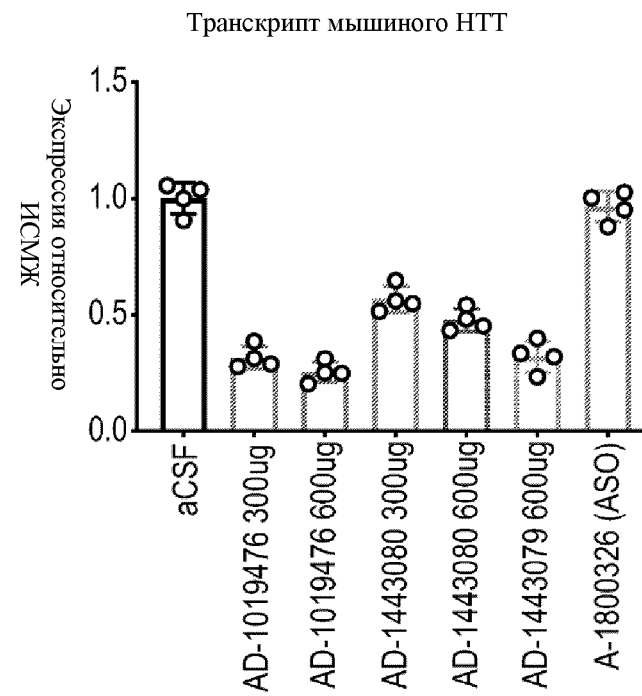


		ГМ- префронт кора			ГМ - гиппокамп			ГМ – хвост. ядро стриатума			Позв. – пояснич. отдел			Позв.- грудной отдел		
Обработка	Исследуемая доза (мг)	Средн. знач. НТТ (нг/мг)	% K/D	SD	Средн. знач. НТТ (нг/мг)	% K/D	SD	Средн. знач. НТТ (нг/мг)	% K/D	SD	Средн. знач. НТТ (нг/мг)	% K/D	SD	Средн. знач. НТТ (нг/мг)	% K/D	SD
aCSF	0	35.91	0.000	44.96	39.13	0.000	60.01	50.85	0.000	47.02	19.61	0.000	26.53	27.85	0.000	8.20
AD-1019465	60	9.36	73.935	14.10	6.56	83.241	1.27	46.35	8.862	60.69	19.17	2.246	17.31	15.81	43.223	7.52
AD-1271082	60	25.25	29.687	14.38	10.25	73.800	8.68	194.83	283.104	39.25	17.23	12.167	7.59	16.68	40.108	10.50
AD-1271085	60	0.97	97.307	0.93	2.04	94.774	3.99	29.01	42.964	30.91	6.18	68.483	2.40	4.69	83.147	2.04

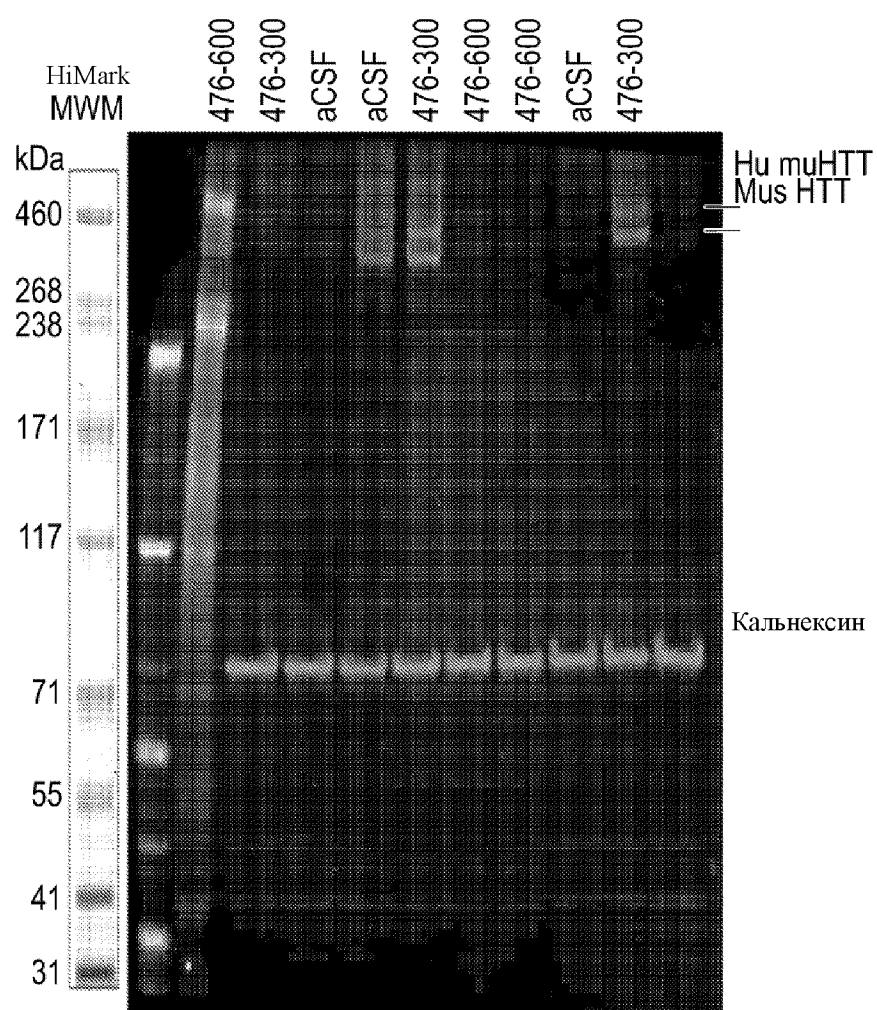
Фиг. 9



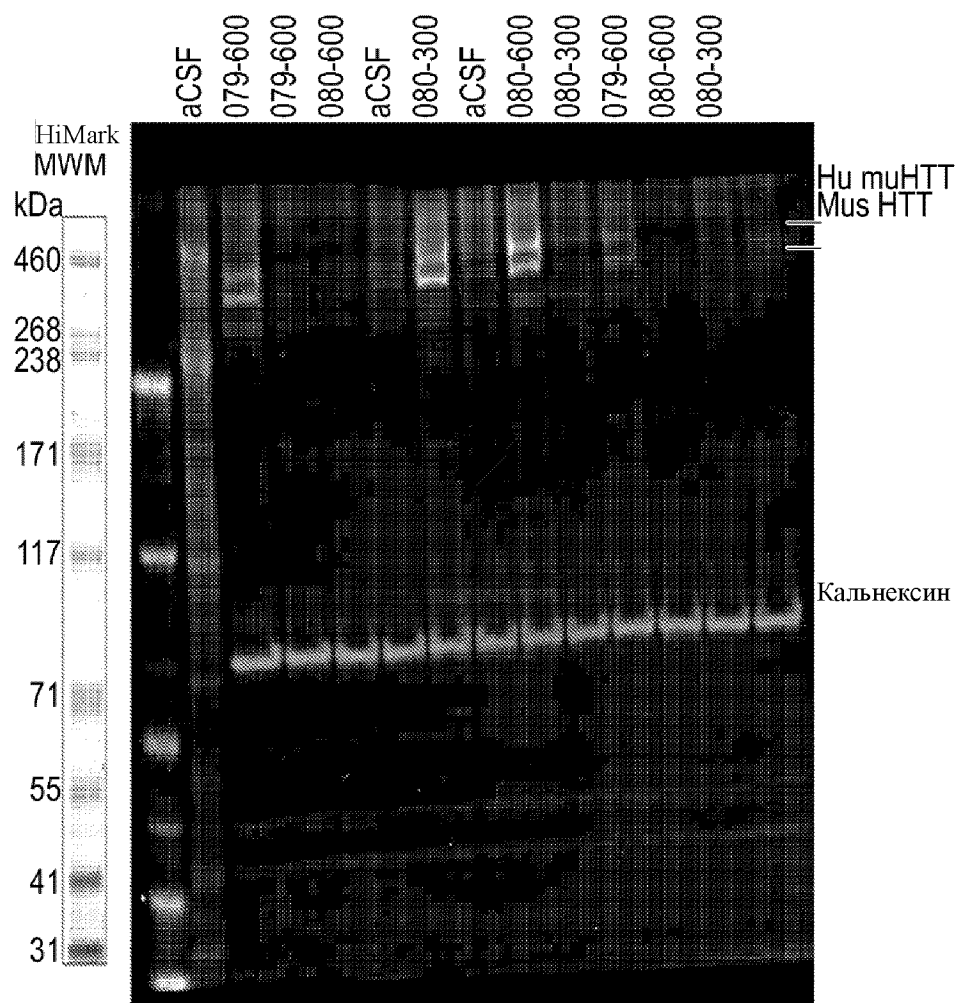
Фиг. 10А



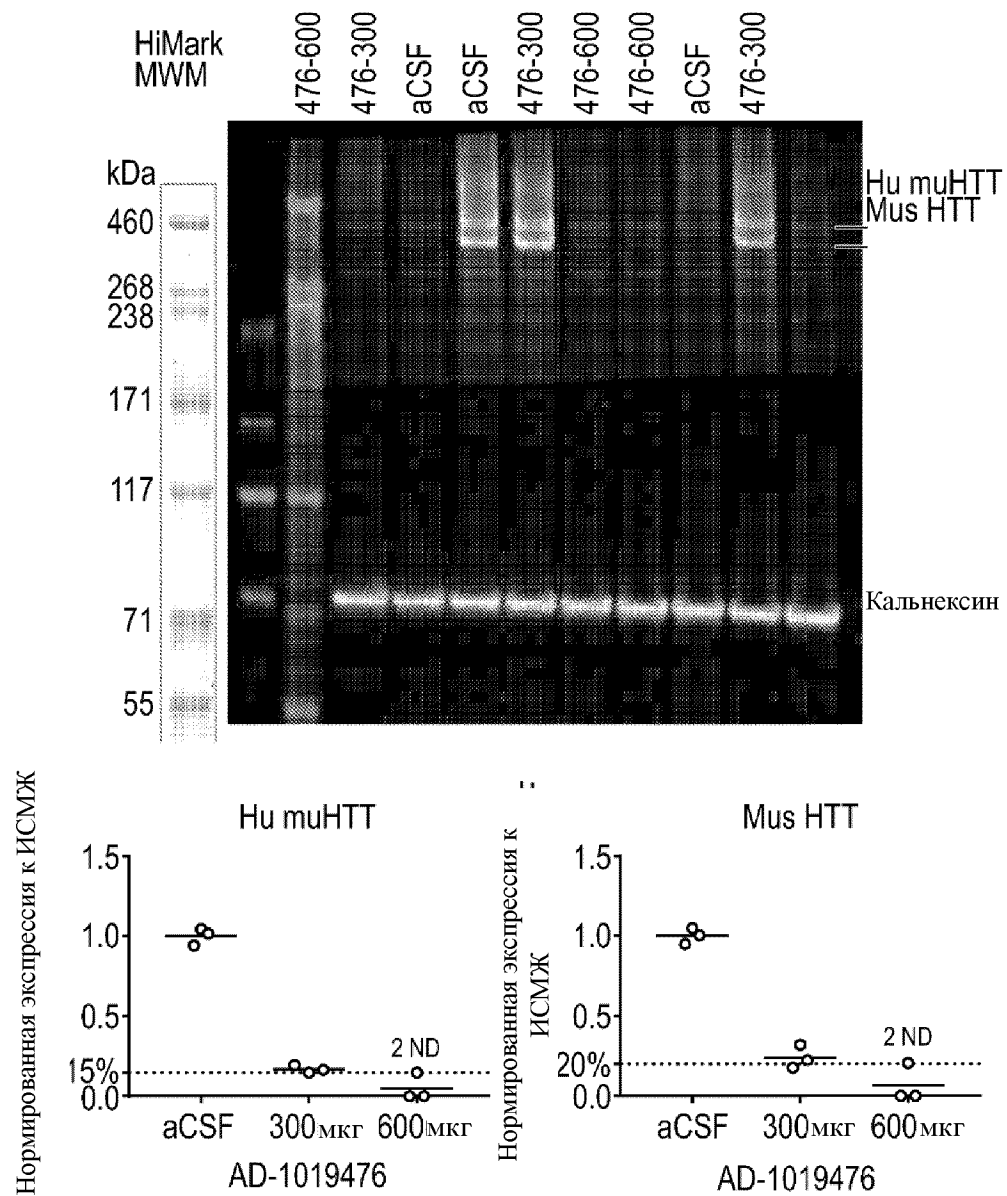
Фиг. 10В



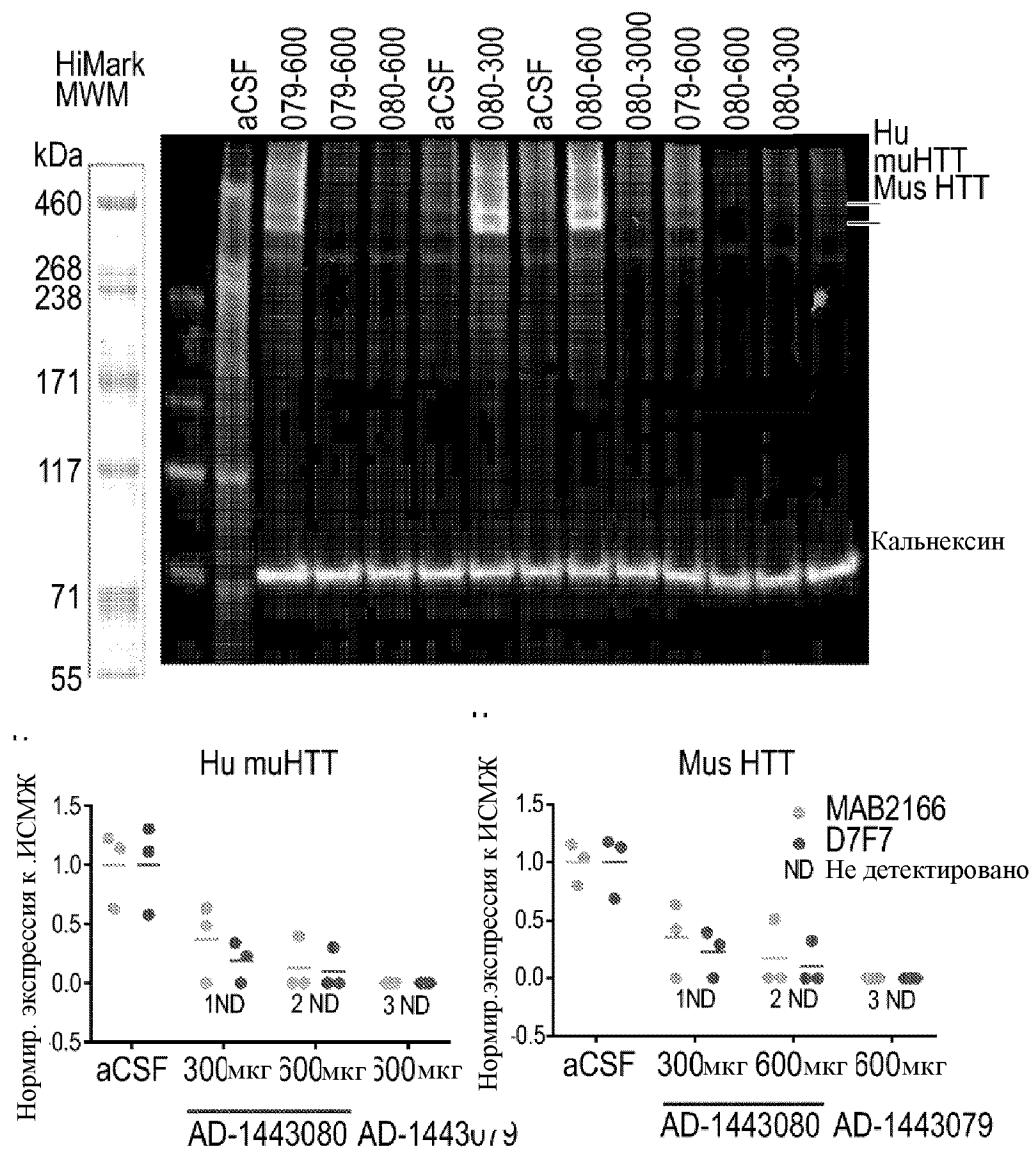
Фиг. 10С



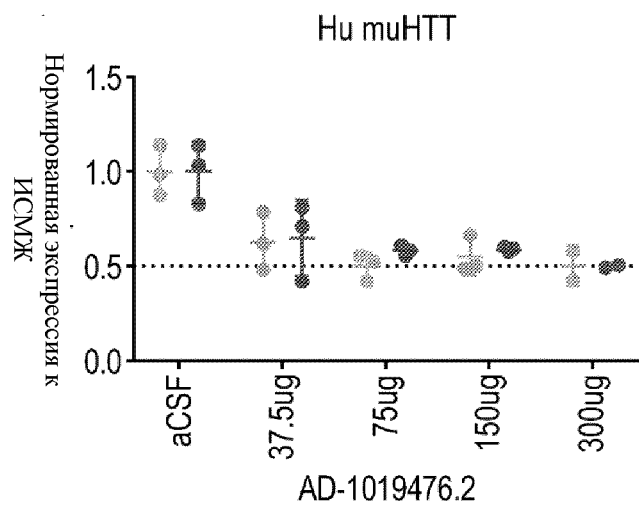
Фиг. 10D



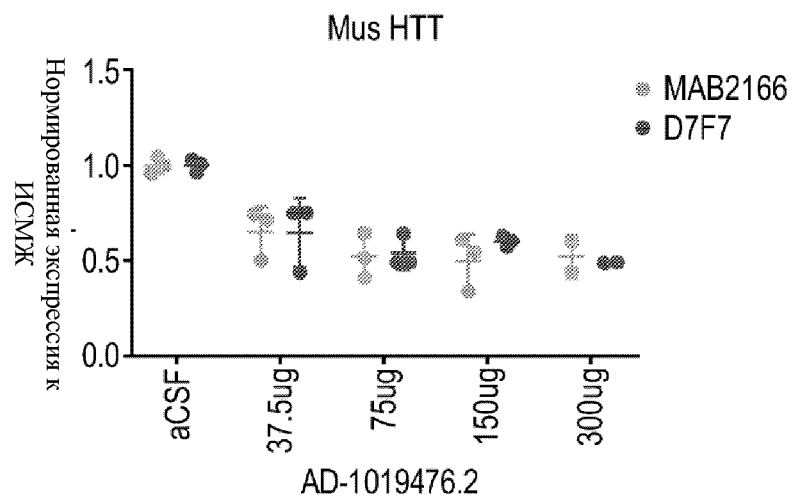
Фиг. 10E



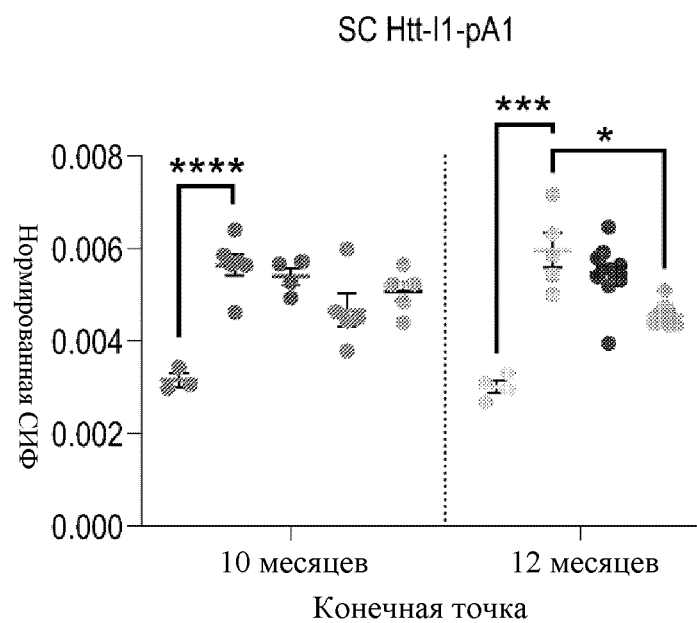
Фиг. 10F



Фиг. 11A



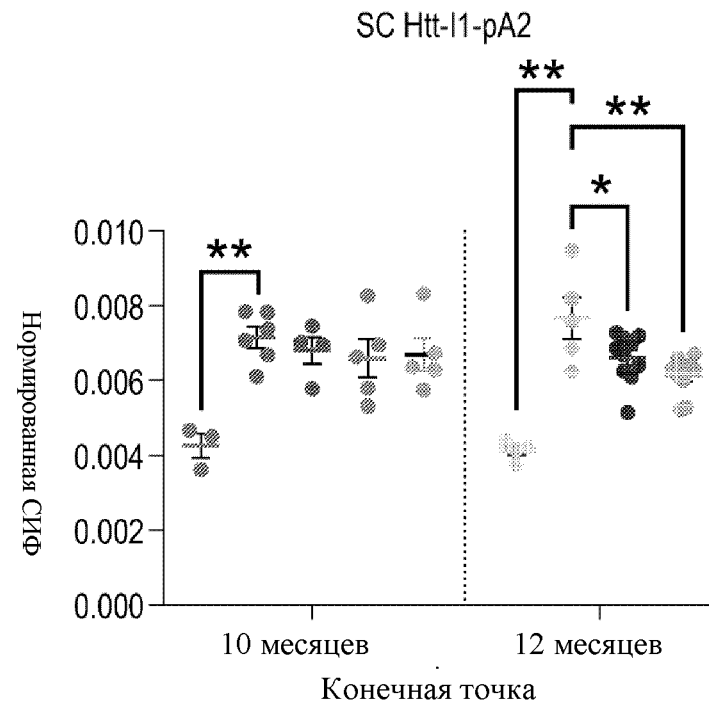
Фиг. 11B



- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)

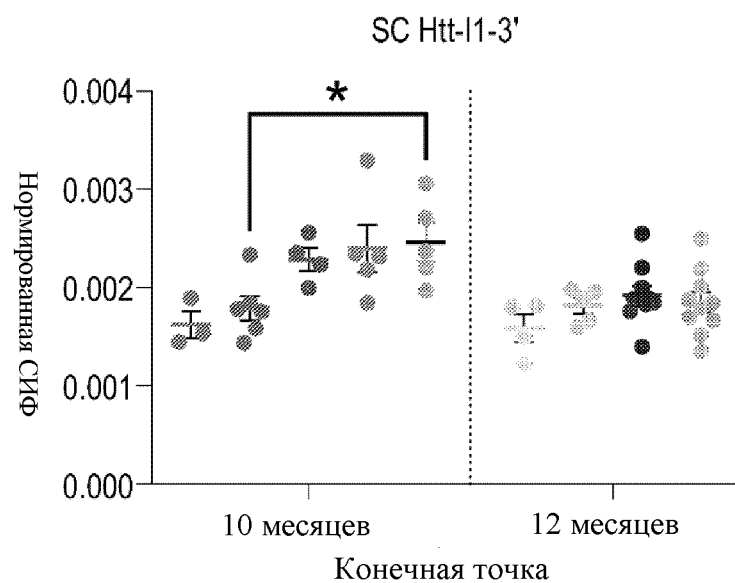
Фиг. 12А

Фиг. 12В

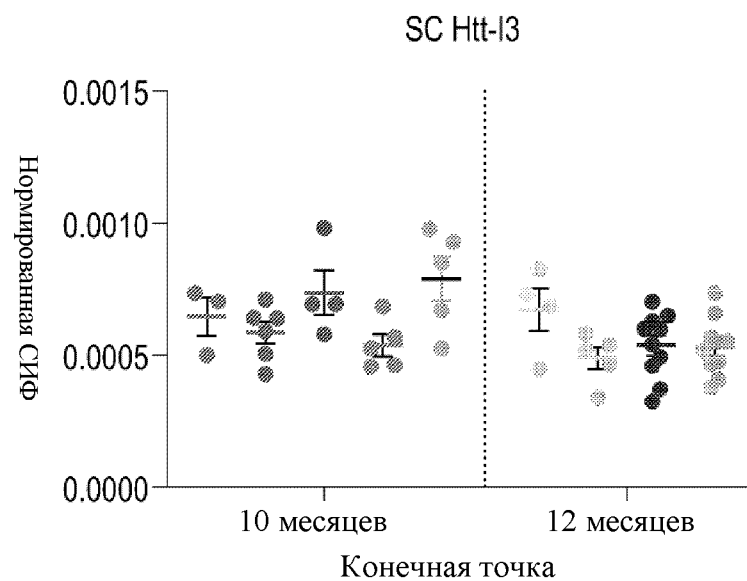


- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)

Фиг. 12С



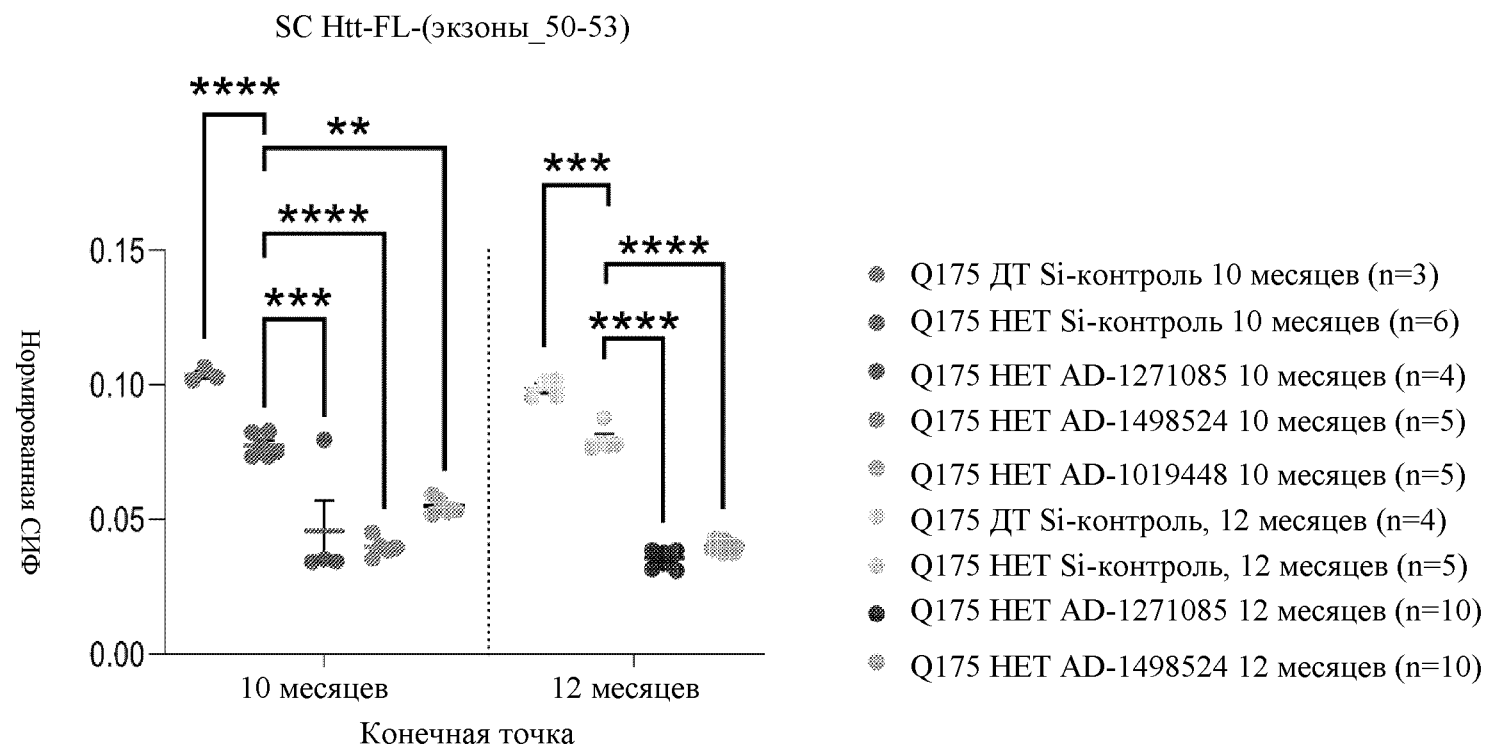
- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)



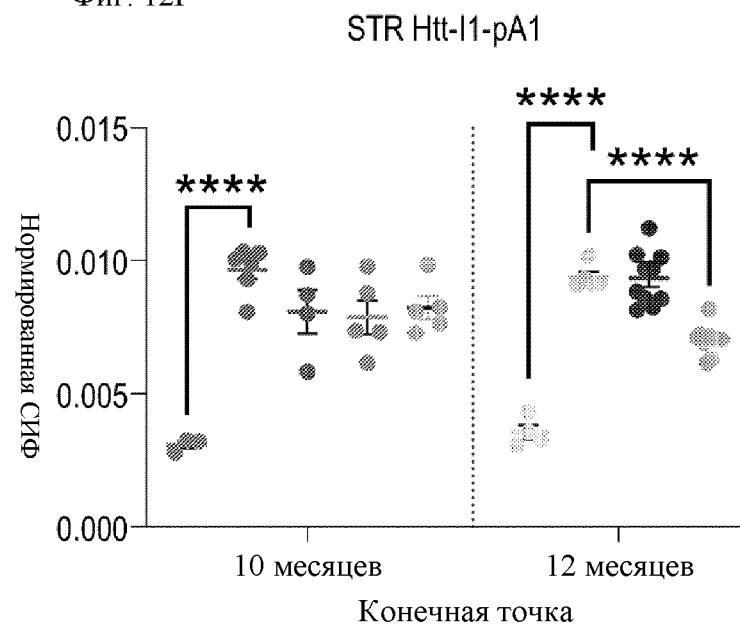
Фиг. 12D

- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 НЕТ Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 НЕТ AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 НЕТ AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 НЕТ AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 НЕТ Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 НЕТ AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 НЕТ AD-1498524 12 месяцев (n=10)

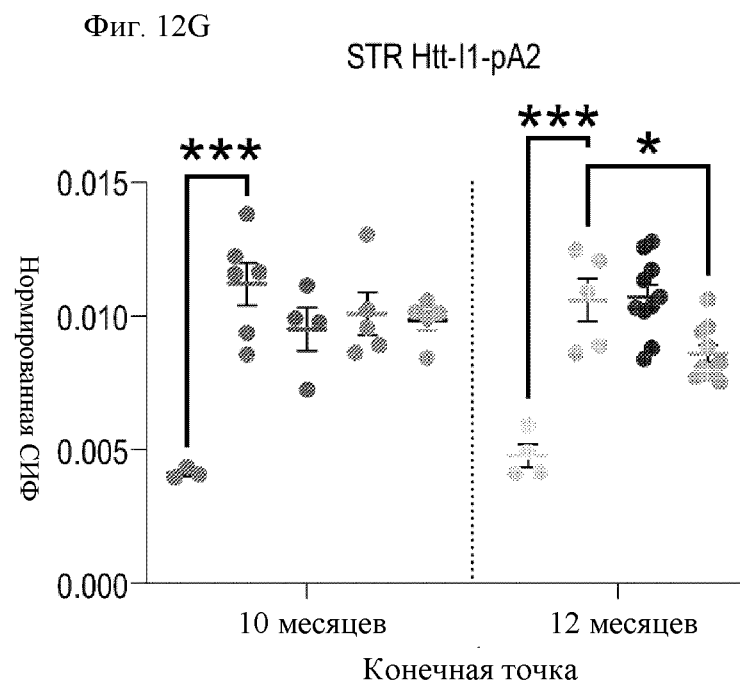
Фиг. 12E



Фиг. 12F

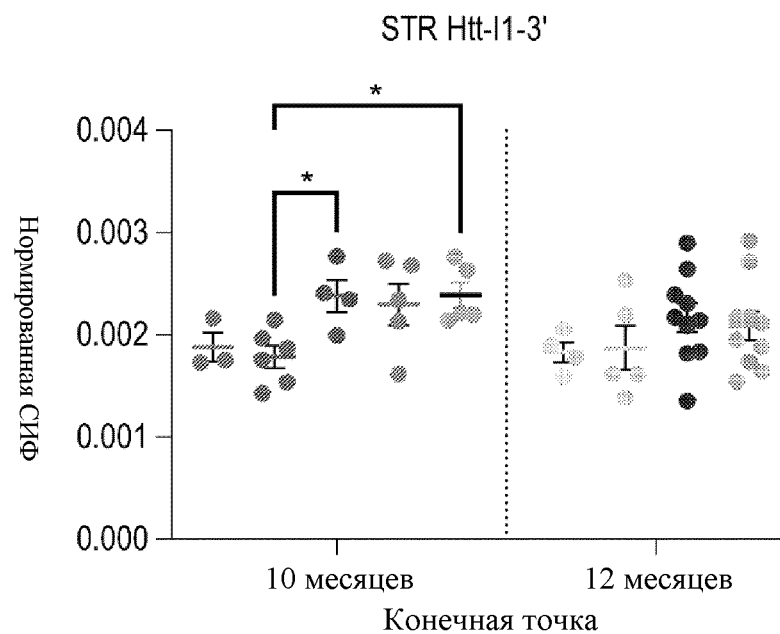


- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)

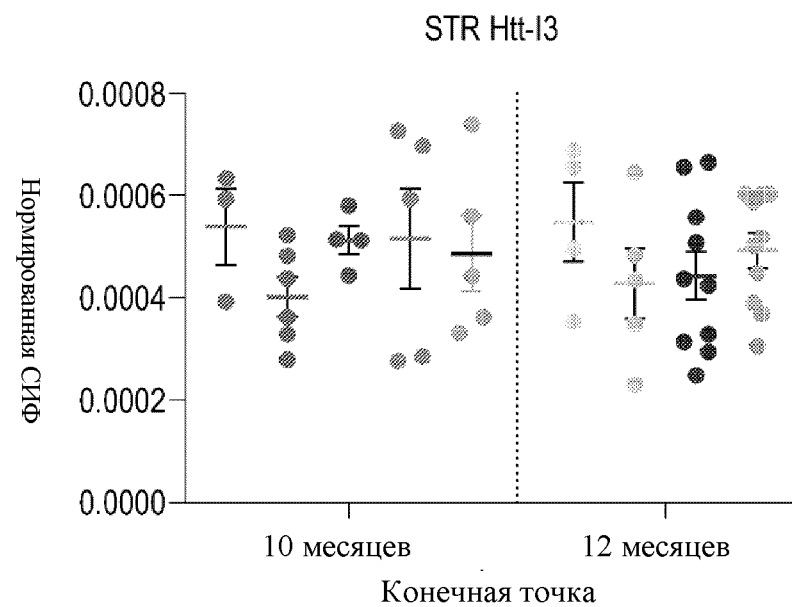


- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)

Фиг. 12Н



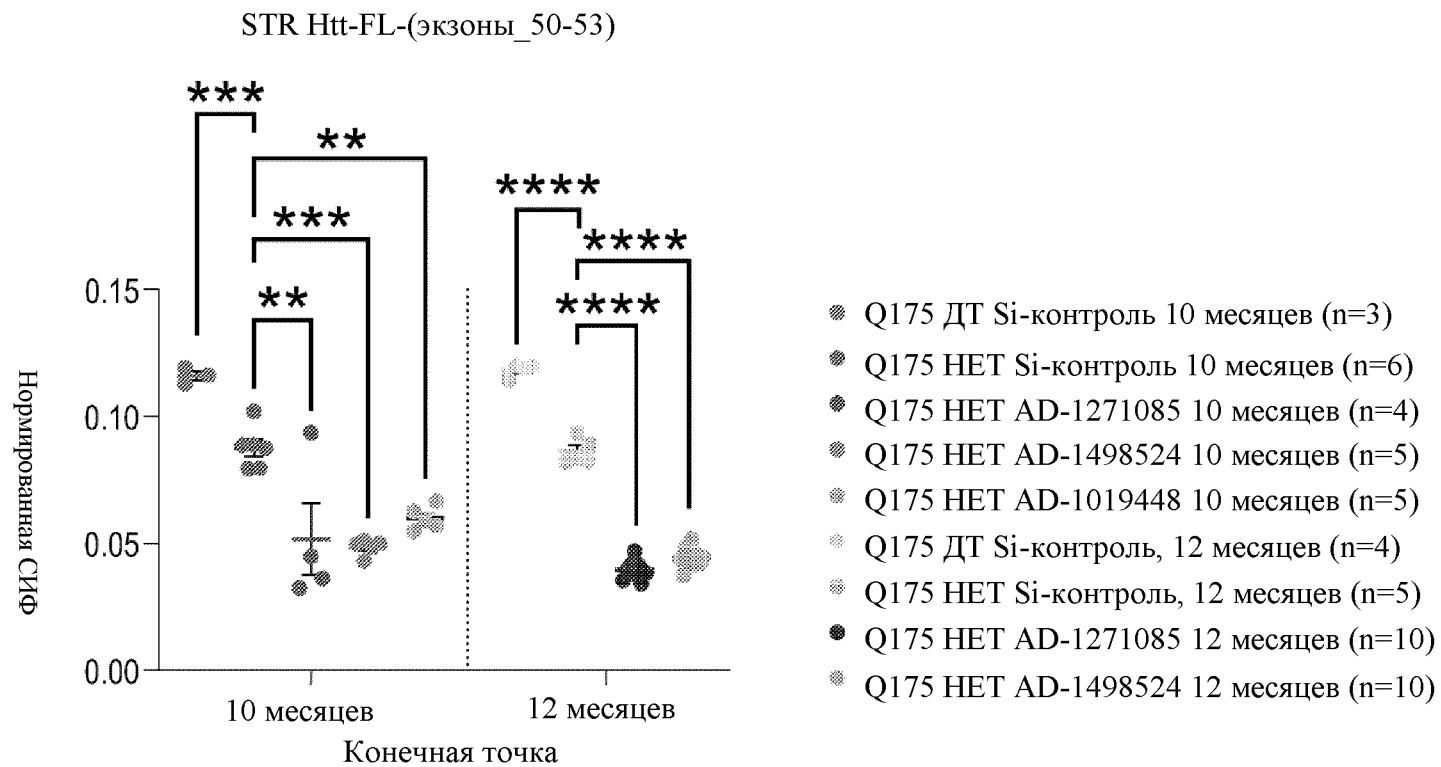
- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)



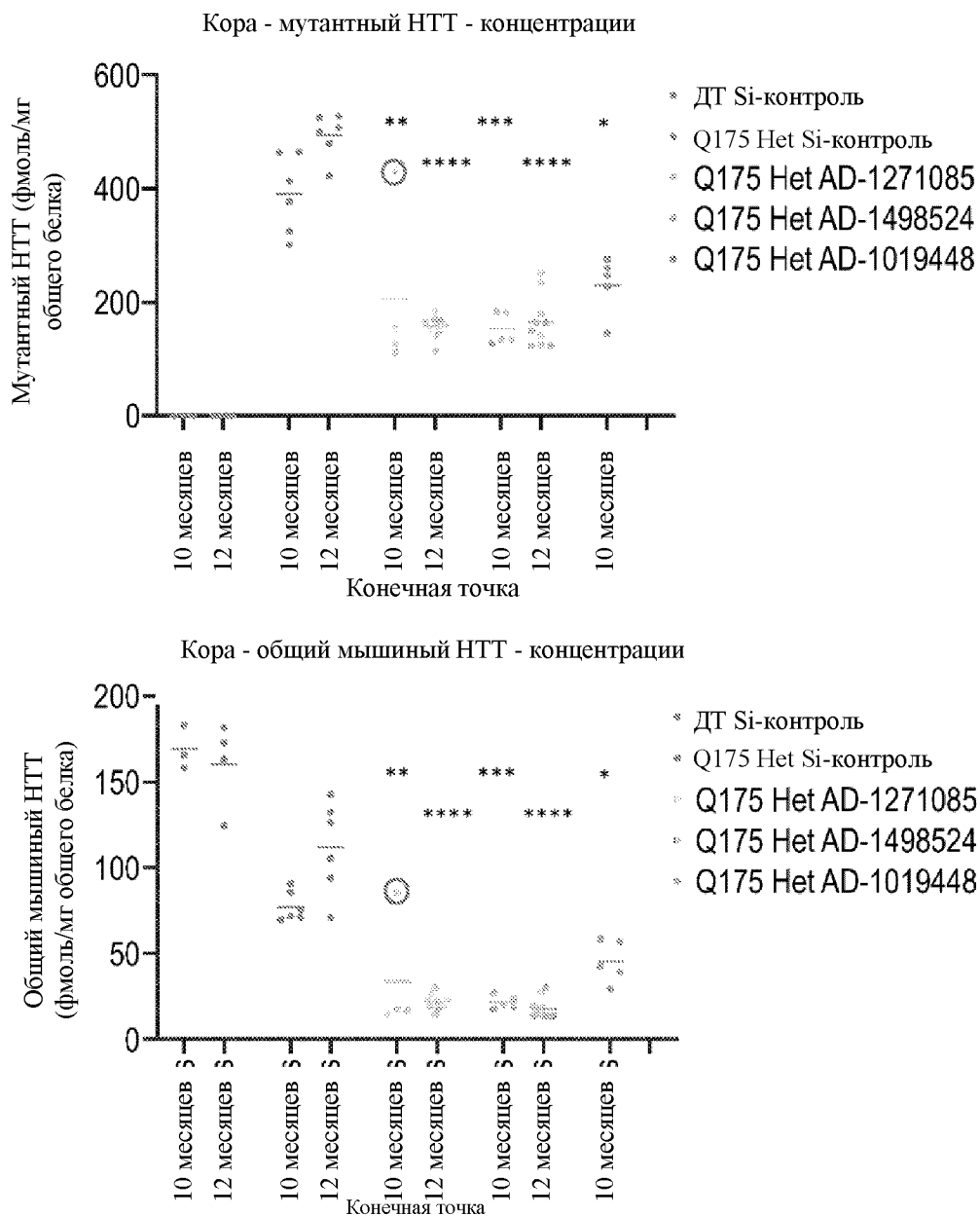
Фиг. 12I

- Q175 ДТ Si-контроль 10 месяцев (n=3)
- Q175 HET Si-контроль 10 месяцев (n=6)
- Q175 HET AD-1271085 10 месяцев (n=4)
- Q175 HET AD-1498524 10 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1019448 10 месяцев (n=5)
- Q175 ДТ Si-контроль, 12 месяцев (n=4)
- Q175 HET Si-контроль, 12 месяцев (n=5)
- Q175 HET AD-1271085 12 месяцев (n=10)
- Q175 HET AD-1498524 12 месяцев (n=10)

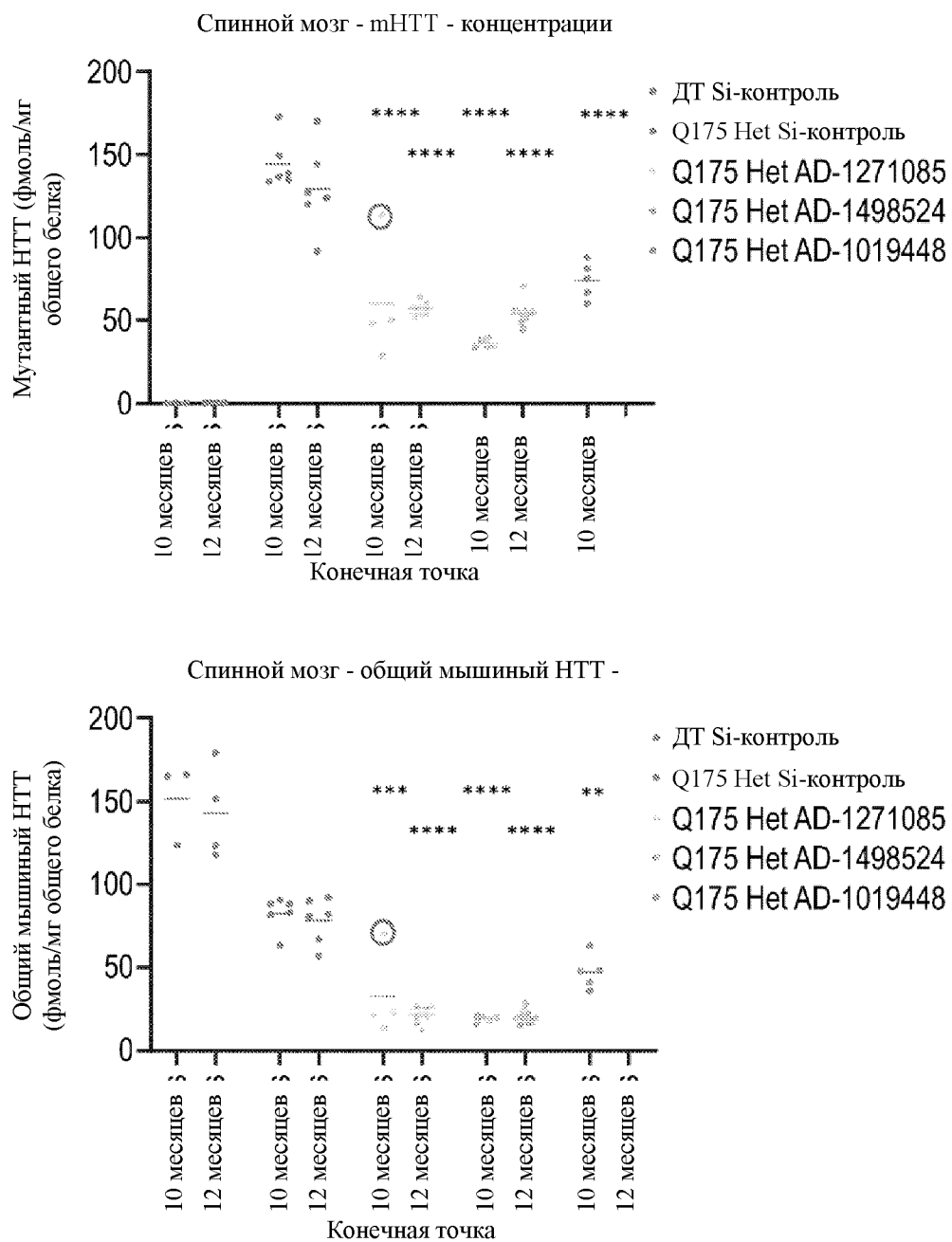
Фиг. 12J



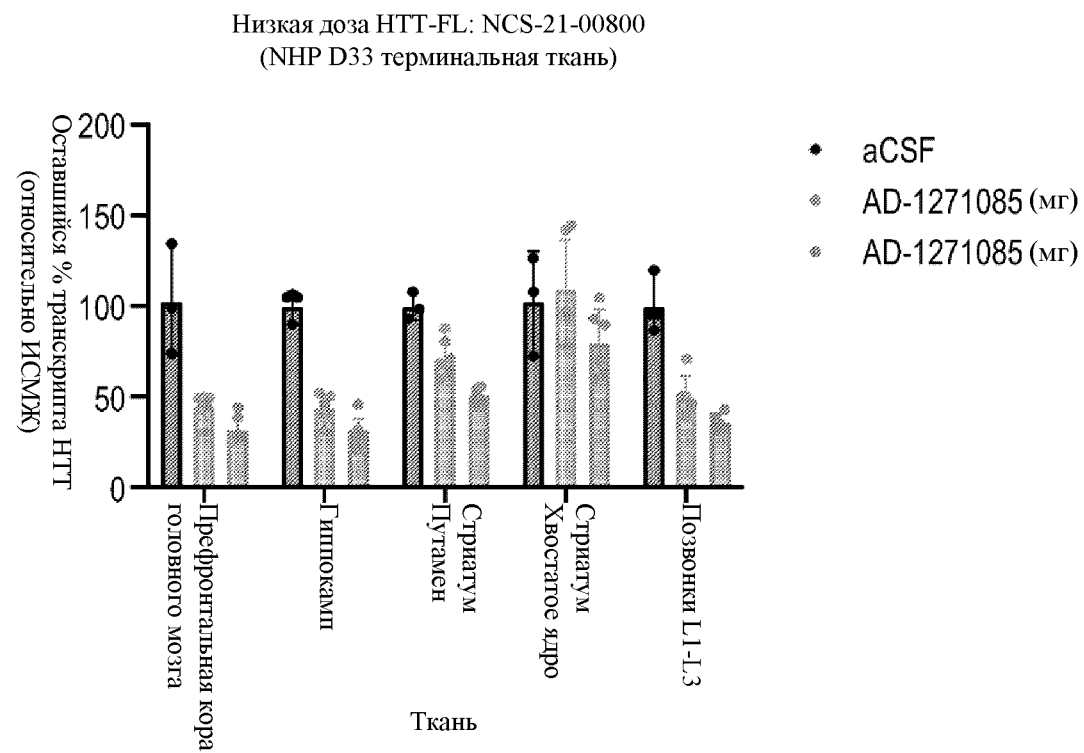
Фиг. 12К



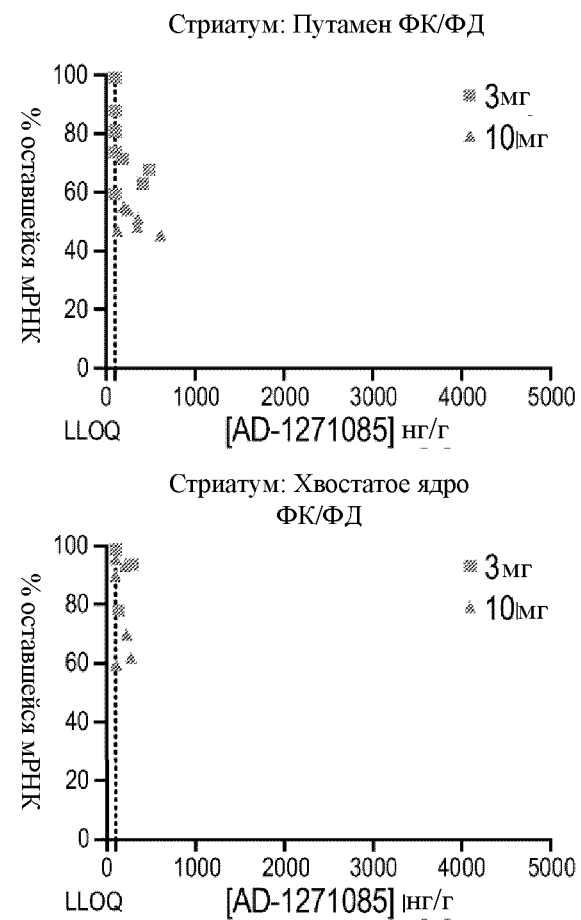
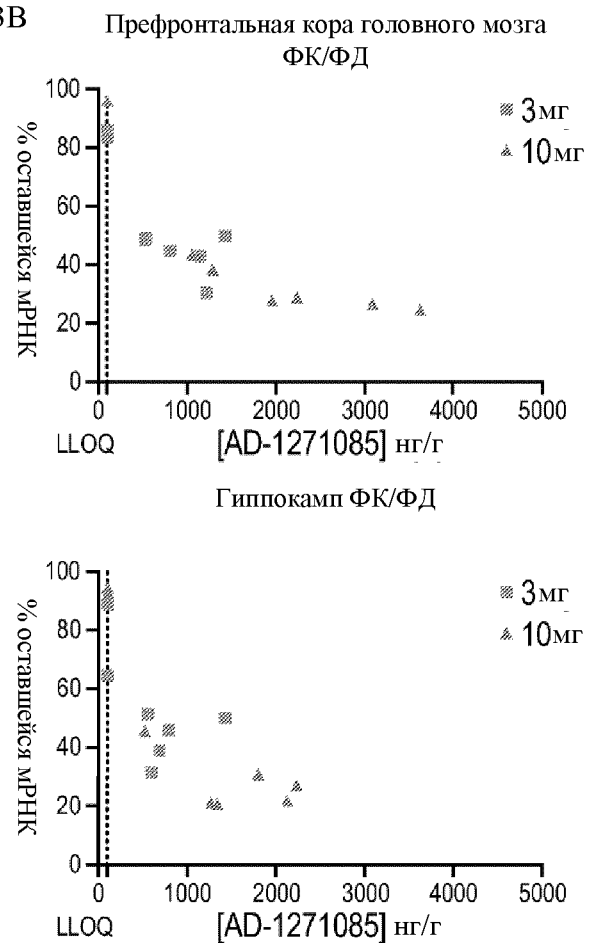
Фиг. 12L



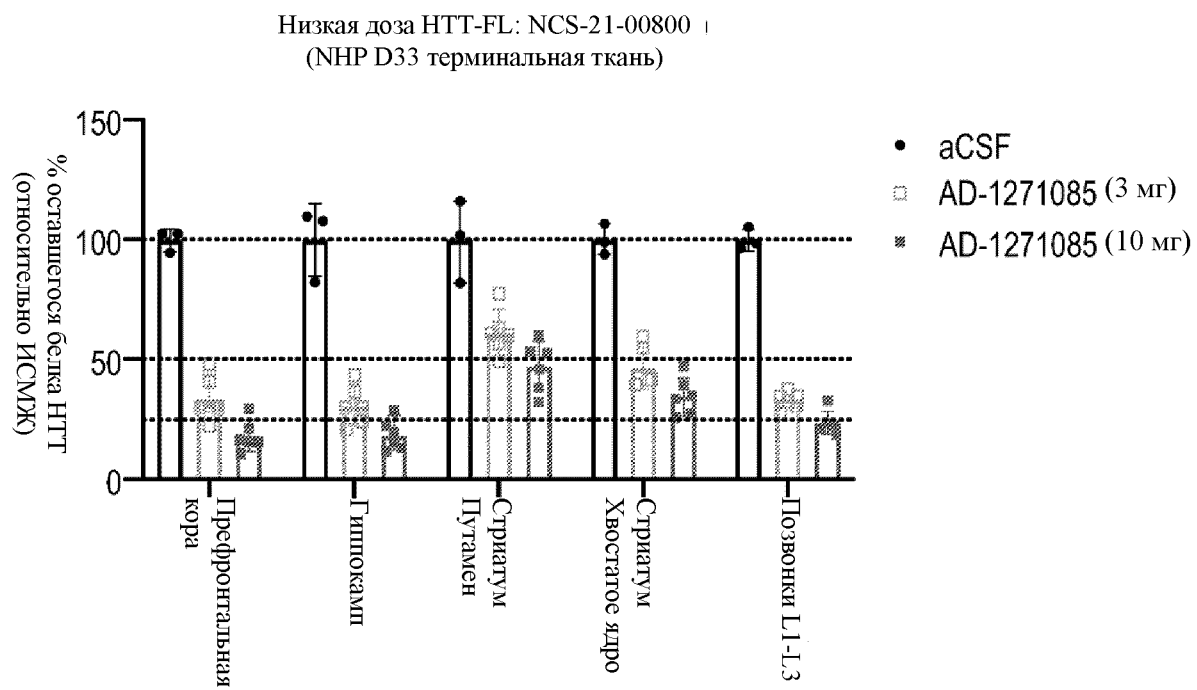
Фиг. 13А



Фиг. 13В

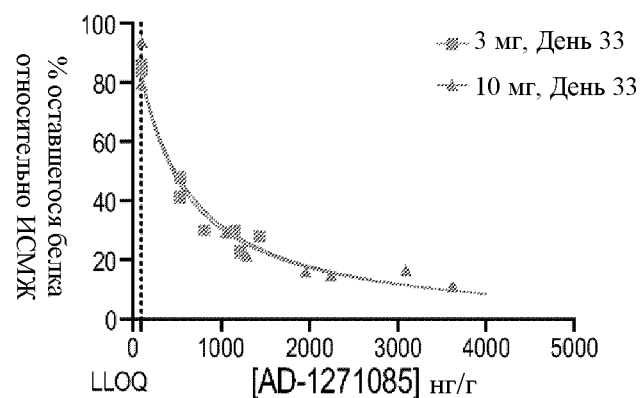


Фиг. 13С

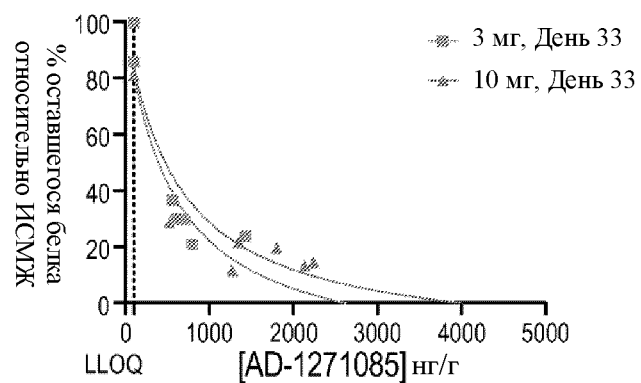


Фиг. 13D

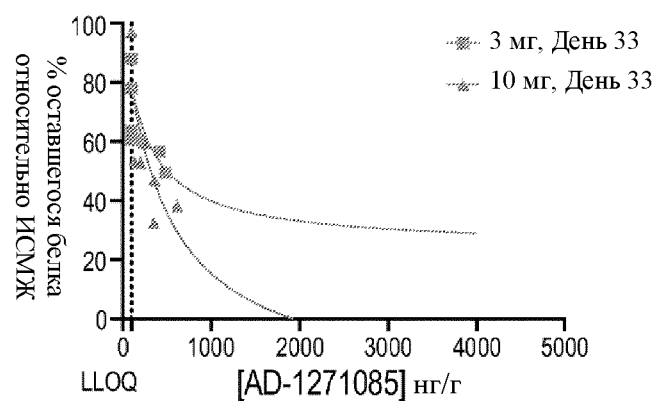
Префронтальная кора головного мозга
ФК/ФД



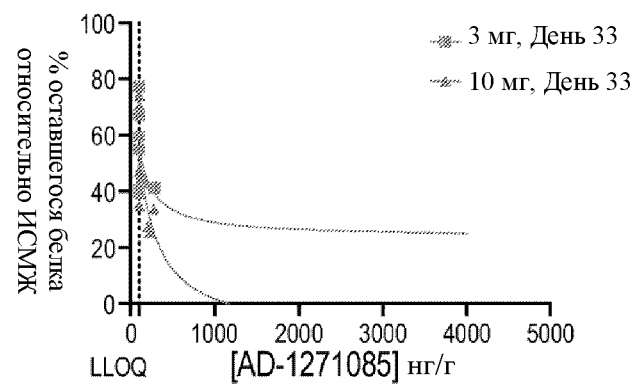
Гиппокамп ФК/ФД



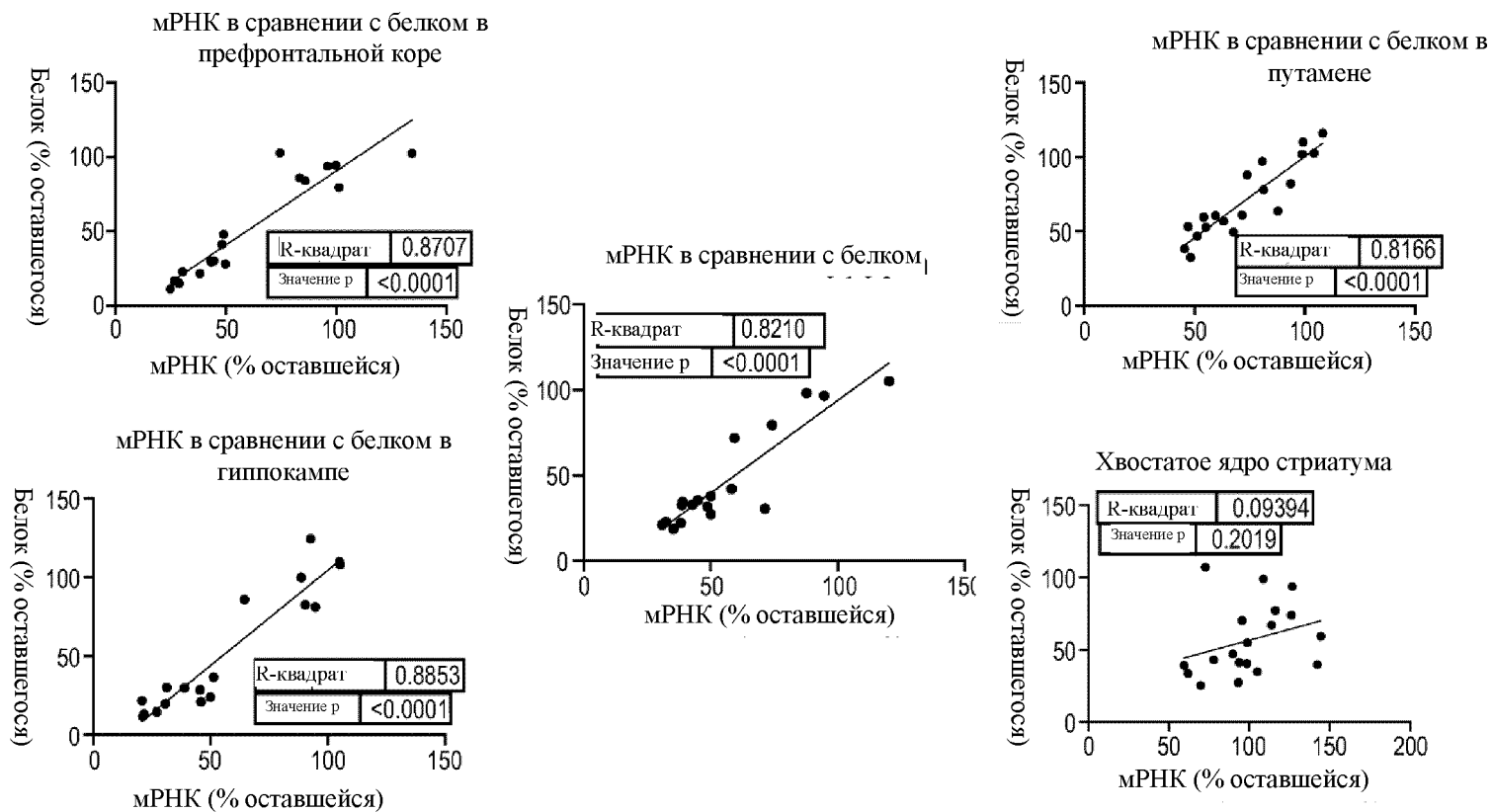
Стриатум: Путамен ФК/ФД



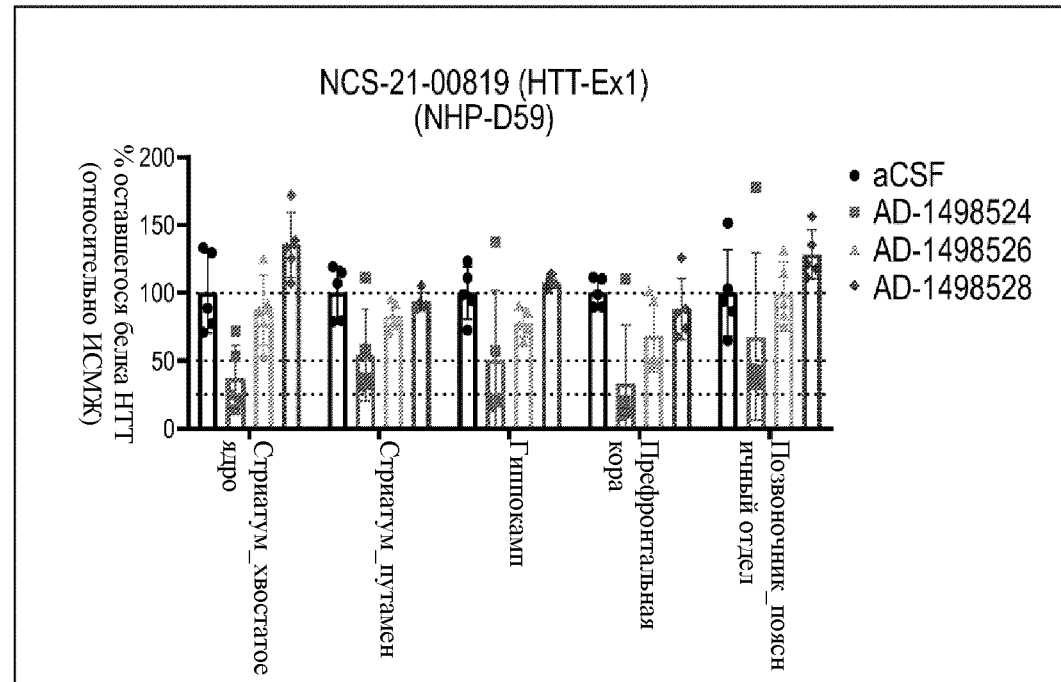
Стриатум: Хвостатое ядро ФК/ФД



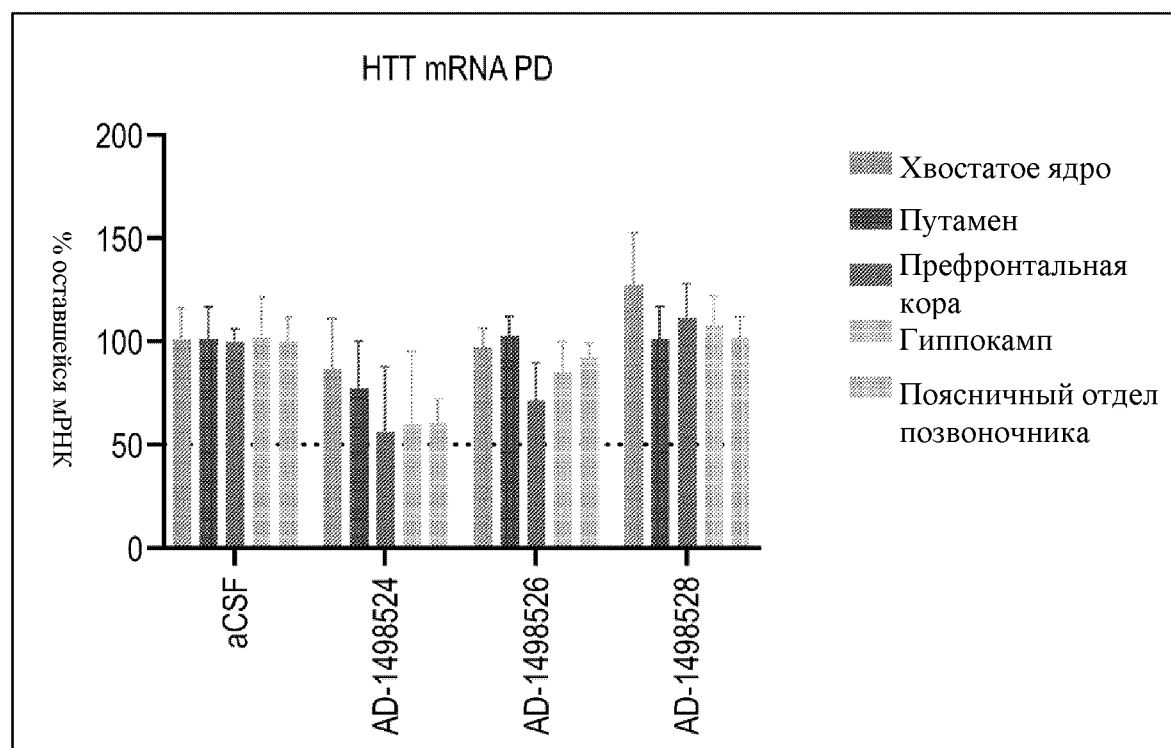
Фиг. 13Е



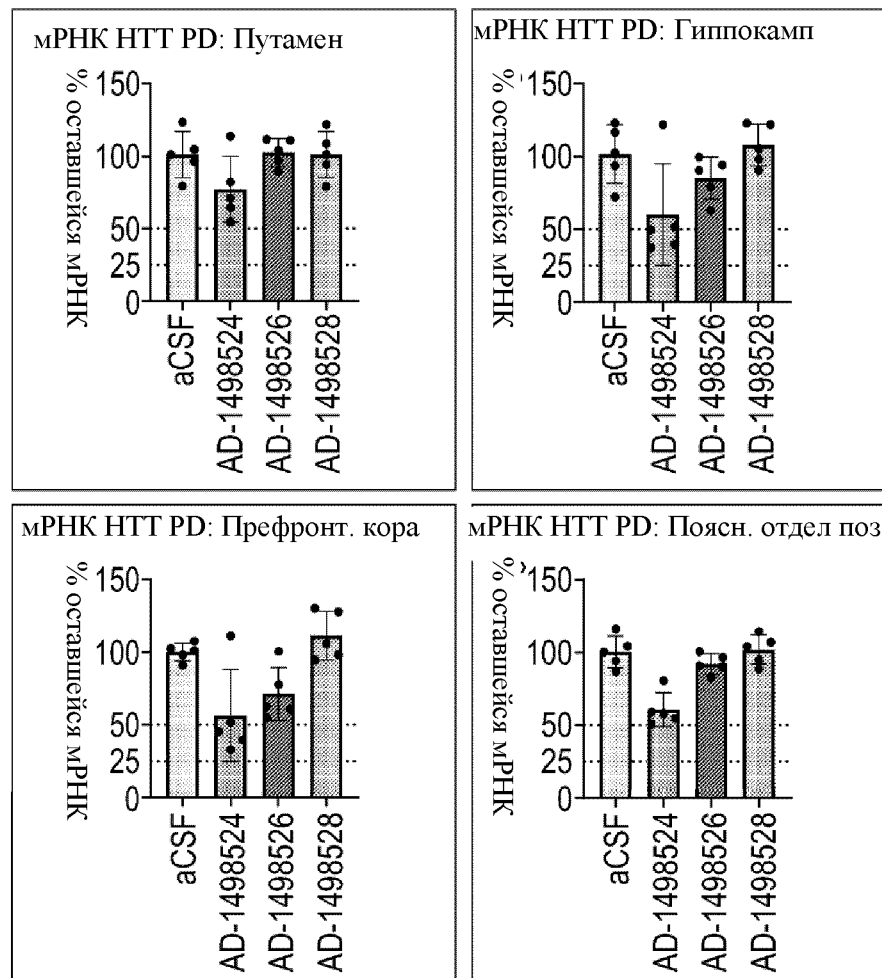
Фиг. 14А



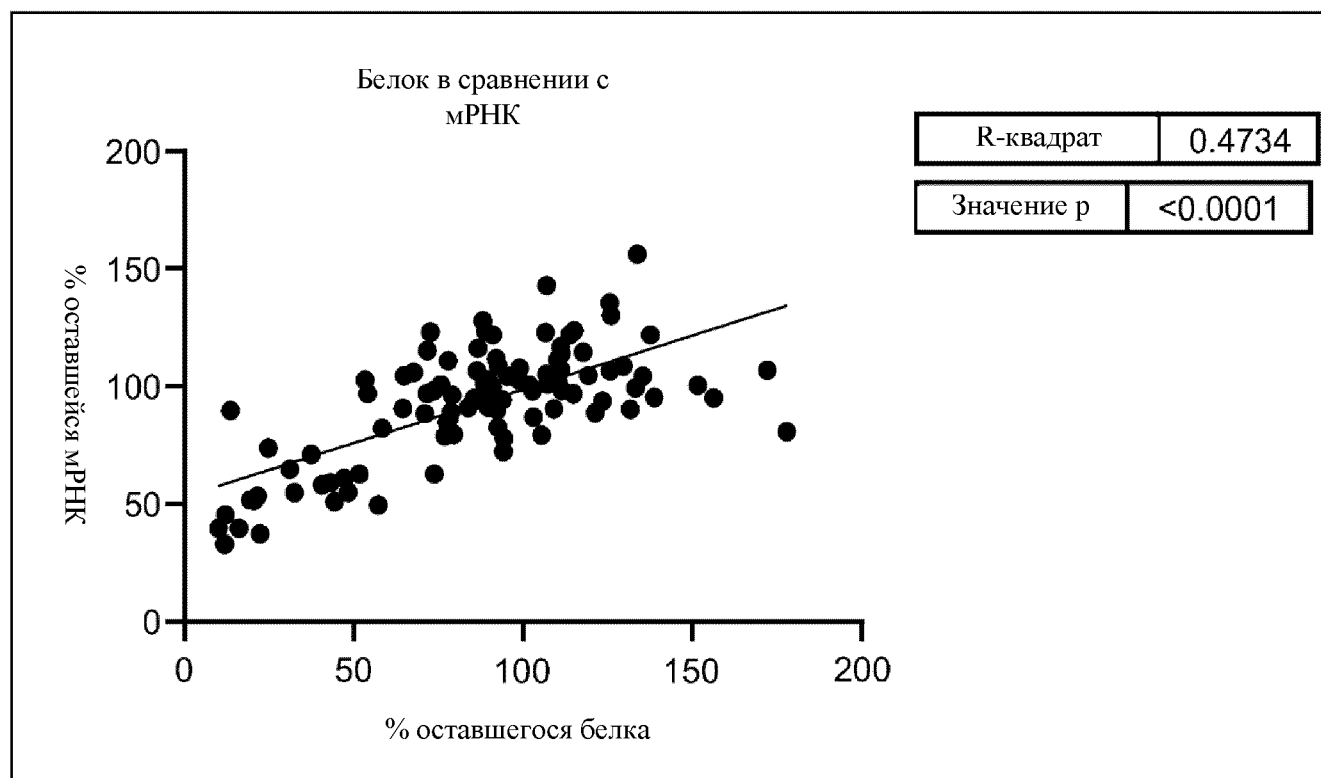
Фиг. 14В



Фиг. 14С



Фиг. 14D



Фиг. 15

