

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048153**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.30

(51) Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(21) Номер заявки
202092661

(22) Дата подачи заявки
2019.05.07

(54) **ВНЕПЕЧЕНОЧНАЯ ДОСТАВКА**

(31) **62/668,072; 62/738,747; 62/773,082**

(32) **2018.05.07; 2018.09.28; 2018.11.29**

(33) **US**

(43) **2021.02.24**

(86) **PCT/US2019/031170**

(87) **WO 2019/217459 2019.11.14**

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

(72) Изобретатель:
**Наир Джаяпракаш К., Майер Мартин,
Джадхав Васант, Милстейн Стюарт,
Браун Кирк, Пармар Рубина Г.,
Раджив Каллантхоттатхил Г.,
Манохаран Мутхиах, Кел'ин
Александр В., Джаяраман Мутхусами,
Хариссе Клаус, Касторено Адам, Тейл
Кристофер С., Фитцджеральд Кевин
(US)**

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

(56) **WO-A2-2010039548**

TAKESHI YAMADA ET AL.: "Versatile Site-Specific Conjugation of Small Molecules to siRNA Using Click Chemistry", THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 76, no. 5, 4 March 2011 (2011-03-04), pages 1198-1211, XP055013736, ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo101761g, page 1198; figure 3; tables 1, 3; compounds 53/58, 54/58

BRANDON J. PEEL ET AL.: "Conjugation and Evaluation of Small Hydrophobic Molecules to Triazole-Linked siRNAs", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 6, no. 2, 12 February 2015 (2015-02-12), pages 117-122, XP055288657, US, ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/ml500260j, table 1

EP-A1-2857513

(57) Изобретение относится к способу сайленсинга генов, предусматривающему введение в клетку или субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества двухцепочечных iRNA, конъюгированных с липофильными фрагментами в одном или нескольких внутренних положениях по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

B1

048153

048153 B1

Данная заявка заявляет преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 62/668072, поданной 7 мая 2018 г.; предварительной заявки на патент США № 62/738747, поданной 28 сентября 2018 г.; а также предварительной заявки на патент США № 62/773082, поданной 29 ноября 2018 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Предпосылки создания изобретения

Эффективная доставка средства на основе iRNA в клетки *in vivo* требует специфического нацеливания и существенной защиты от внеклеточной среды, в частности сывороточных белков. Терапевтические средства для RNAi демонстрируют многообещающие клинические данные для лечения нарушений, связанных с печенью. Однако доставка siRNA в ткани, находящиеся за пределами печени, остается препятствием, ограничивающим применение видов терапии на основе siRNA.

Одним из факторов, которые ограничивают экспериментальное и терапевтическое применение средств на основе iRNA *in vivo*, является возможность эффективной доставки интактной siRNA. Особые трудности были связаны с переносом невирусных генов в сетчатку *in vivo*. Одна из задач представляет собой преодоление внутренней ограничивающей мембраны, которая препятствует трансфекции сетчатки. Кроме того, было показано, что отрицательно заряженные сахара стекловидного тела взаимодействуют с положительными комплексами реагентов для ДНК-трансфекции, способствуя их агрегации, что препятствует диффузии и поглощению клетками.

Доставка олигонуклеотидов в центральную нервную систему (ЦНС) связана с рядом проблем ввиду наличия гематоэнцефалического барьера (BBB), который свободные олигонуклеотиды не могут преодолеть. Одним из способов доставки олигонуклеотидов в ЦНС является интратекальная доставка. Однако олигонуклеотиды также должны эффективно интернализироваться в целевые клетки ЦНС для достижения желаемого терапевтического эффекта. В предыдущих работах для обеспечения внутриклеточной интернализации олигонуклеотидов в клетки нейронального происхождения, как правило, применяли реагенты для доставки, такие как липосомы, катионные липиды и наночастицы, образующие комплексы.

Таким образом, существует постоянная потребность в новых и улучшенных способах доставки молекул siRNA *in vivo* без применения реагентов для доставки в ткани для достижения и повышения терапевтического потенциала средств на основе iRNA.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения представлено средство на основе двухцепочечной iRNA, содержащее следующее:

антисмысловая цепь, которая комплементарна целевому гену; смысловая цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

В некоторых вариантах осуществления липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью коэффициента распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, превышает 0. Липофильный фрагмент может иметь $\log K_{ow}$, превышающий 1, превышающий 1,5, превышающий 2, превышающий 3, превышающий 4, превышающий 5 или превышающий 10.

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность средства на основе двухцепочечной iRNA, измеренная посредством несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови для средства на основе двухцепочечной iRNA, превышает 0,2. В одном варианте осуществления осуществляемый анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с применением белка, представляющего собой сывороточный альбумин человека. Гидрофобность средства на основе двухцепочечной iRNA, измеренная по фракции несвязанной siRNA 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 при улучшенной доставке siRNA *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, циклическое, такое как алициклическое, или полициклическое, такое как полиалициклическое соединение, такое как стероид (например, стерол), или линейный или разветвленный алифатический углеводород. Примеры липофильных фрагментов включают липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексаноид, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеил)литохолевую кислоту, О3-(олеил)холеновую кислоту, ибупрофен, напроксен, диметокситритил или феноксазин.

Подходящие липофильные фрагменты также включают те, которые содержат насыщенную или ненасыщенную C₄-C₃₀-углеводородную цепь (например, C₄-C₃₀-алкил или -алкенил) и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина. Функциональные группы используются для присоединения липофильного фрагмента к средству на основе iRNA. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₆-C₁₈-углеводородную цепь (например, линейный C₆-C₁₈-алкил или -алкенил). В одном варианте осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₁₆-углеводородную цепь (например, линейный C₁₆-алкил или -алкенил).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой C₆-C₃₀ кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексановую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т.д.) или C₆-C₃₀-спирт (например, гексано́л, гептано́л, октано́л, нонано́л, декано́л, ундекано́л, додекано́л, тридекано́л, тетрадекано́л, пентадекано́л, гексадекано́л, гептадекано́л, октадекано́л, олеило́вый спирт, линолеило́вый спирт, арахидоно́вый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексано́л, ретино́л, витамин Е, холестерин и т.п.).

Липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством на основе iRNA посредством прямого присоединения к рибосахару средства на основе iRNA. Альтернативно, липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством на основе iRNA посредством линкера или носителя.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе iRNA посредством одного или нескольких линкеров (связывающих фрагментов).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочеви́ну, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол из азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из линкеров (связывающих фрагментов) представляет собой линкер, расщепляемый посредством окислительно-восстановительной реакции (такой как линкер, расщепляемый при восстановлении; например, дисульфидная группа), линкер, расщепляемый кислотой (например, гидразоновая группа, сложноэфирная группа, ацетальная группа или кетальная группа), линкер, расщепляемый эстеразой (например, сложноэфирная группа), линкер, расщепляемый фосфатазой (например, фосфатная группа), или линкер, расщепляемый пептидазой (например, пептидная связь).

В других вариантах осуществления по меньшей мере один из линкеров (связывающих фрагментов) представляет собой биологически расщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA при помощи носителя, который заменяет один или несколько нуклеотидов. Носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. В одном варианте осуществления циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолидинила, пиразолидинила, имидазолидинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. В одном варианте осуществления ациклическая группа представляет собой фрагмент на основании остова из серинола или остова из диэтанолamina.

В некоторых вариантах осуществления носитель заменяет один или несколько нуклеотидов во внутреннем(их) положении(ях) средства на основе двухцепочечной iRNA.

В других вариантах осуществления носитель заменяет нуклеотиды на терминальном конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления носитель заменяет концевой нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи, тем самым функционируя в качестве концевого колпачка, защищающего 3'-конец смысловой цепи. В одном варианте осуществления носитель представляет собой циклическую группу, содержащую амин, например носитель может представлять собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые включают все положения, за исключением двух концевых положений на каждом конце цепи. В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые включают все положения, за исключением трех концевых положений на каждом конце цепи.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими положениями по меньшей мере одного конца дуплексного участка, которые включают все положения в дуплексном участке, но не включают выступающий участок или носитель, который заменяет концевой нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован со смысловой цепью в пределах первых пяти пар оснований на 5'-конце антисмысловой цепи дуплексного участка.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован со смысловой цепью в пределах первых четырех пар оснований на 5'-конце антисмысловой цепи дуплексного участка.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован со смысловой цепью в пределах первых трех пар оснований на 5'-конце антисмысловой цепи дуплексного участка.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован со смысловой цепью в пределах первых двух пар оснований на 5'-конце антисмысловой цепи дуплексного участка.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один липофильный фрагмент конъюгирован со смысловой цепью в пределах первой пары оснований на 5'-конце антисмысловой цепи дуплексного участка.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые исключают участок сайта расщепления смысловой цепи. Например, внутренние положения исключают положения 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи. Например, внутренние положения исключают положения 9-11, считая от 5'-конца смысловой цепи. В качестве альтернативы, внутренние положения исключают положения 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые исключают участок сайта расщепления антисмысловой цепи. Например, внутренние положения исключают положения 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые исключают положения 11-13 смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положения 12-14 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

В одном варианте осуществления один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 4-8 и 13-18 смысловой цепи и положения 6-10 и 15-18 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

В одном варианте осуществления один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 5, 6, 7, 15 и 17 смысловой цепи и положения 15 и 17 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 15 до 30 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 19 до 25 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 21 до 23 нуклеотидов каждая.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит одноцепочечный выступ, на по меньшей мере один из концов, например 3'- и/или 5'-выступ(ы) длиной 1-10 нуклеотидов, например выступ из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления обе цепи содержат по меньшей мере один отрезок из 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) одноцепочечных нуклеотидов в двухцепочечном участке. В одном варианте осуществления одноцепочечный выступ имеет длину 1, 2 или 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA может также иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конце смысловой цепи), или наоборот. В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит 3'-выступ на 3'-конце антисмысловой цепи и необязательно тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит 5'-выступ на 5'-конце смысловой цепи и необязательно тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA имеет два тупых конца на обоих концах дуплекса iRNA.

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства на основе двухцепочечной iRNA составляет в длину 21 нуклеотид, а длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида, при этом цепи образуют двухцепочечный участок из 21 последовательной пары оснований, имеющих 2-нуклеотидные длинные одноцепочечные выступы на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью средства на основе двухцепочечной iRNA.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец антисмысловой цепи средства на основе двухцепочечной iRNA не содержит 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит по меньшей мере один концевой хиральный атом фосфора.

Сайт-специфическая хиральная модификация межнуклеотидной связи может происходить на 5'-

конце, 3'-конце или как на 5'-конце, так и на 3'-конце цепи. Это упоминается в данном документе как "концевая" хиральная модификация. Концевая модификация может встречаться в 3'- или 5'-концевом положении в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в пределах последних 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов цепи. Хиральная модификация может встречаться в смысловой цепи, антисмысловой цепи или как в смысловой цепи, так и в антисмысловой цепи. Каждый из хиральных чистых атомов фосфора может иметь R_p-конфигурацию или S_p-конфигурацию и их комбинацию. Более подробную информацию о хиральных модификациях и хирально-модифицированных средствах на основе dsRNA можно найти в PCT/US18/67103, озаглавленном "Chirally-Modified Double-Stranded RNA Agents", поданном 21 декабря 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в S_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в S_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в S_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в S_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в S_p-конфигурации; концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора в R_p-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, встречающуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющую связанный атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA имеет по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах в антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит два блока из одной, двух или трех фосфотиоатных 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.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, который опосредует доставку в конкретную ткань ЦНС. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из ангиопепта-2, лиганда белка, родственного липопротеиновому рецептору (LRP), лиганда связывания клетки bEnd.3, лиганда рецептора трансферрина (TfR), лиганда рецептора маннозы, белка-переносчика глюкозы и лиганда рецептора LDL.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, который опосредует доставку в ткань глаза. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из транс-

ретинола, пептида RGD, лиганда рецептора LDL и лигандов на основе углеводов. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд представляет собой пептид RGD, такой как H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH или цикло(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys).

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой лиганд на основе углеводов. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

Все вышеупомянутые аспекты и варианты осуществления могут быть применимы к олигонуклеотиду, имеющему один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% олигонуклеотида модифицировано. Например, если модифицировано 50% олигонуклеотида, то 50% всех нуклеотидов, присутствующих в олигонуклеотиде, предусматривают модификацию, описанную в данном документе.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид представляет собой средство на основе двухцепочечной dsRNA, и по меньшей мере 50% нуклеотидов средства на основе двухцепочечной dsRNA независимо модифицированы 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-дезокси или 2'-фтором.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид является антисмысловым, и по меньшей мере 50% нуклеотидов антисмыслового олигонуклеотида независимо модифицированы LNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом или 2'-дезокси.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA имеет менее 12, менее 10, менее 8, менее 6, менее 4, менее 2 или характеризуется отсутствием модификаций 2'-F в смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA имеет менее 12, менее 10, менее 8, менее 6, менее 4, менее 2 или характеризуется отсутствием модификаций 2'-F в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA имеет одну или несколько модификаций 2'-F в любом положении смысловой цепи или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5% неприродных нуклеотидов или по сути не содержит неприродных нуклеотидов. Примеры неприродных нуклеотидов включают ациклические нуклеотиды, LNA, HNA, CeNA, 2'-О-метоксиалкил (например, 2'-О-метоксиметил, 2'-О-метоксиэтил или 2'-О-2-метоксипропанол), 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-фтор, 2'-О-N-метилацетиламино (2'-О-NMA), 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE), 2'-О-аминопропил (2'-О-AP), 2'-ара-Ф, модификация L-нуклеозида (такая как, 2'-модифицированный L-нуклеозид, например, 2'-дезокси-L-нуклеозид), BNA-сахар с удаленным основанием, циклический алкил и алкил с открытой цепью с удаленным азотистым основанием.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит более 80%, более 85%, более 90%, более 95% или практически 100% природных нуклеотидов. Для целей этих вариантов осуществления природные нуклеотиды могут включать нуклеотиды, содержащие 2'-ОН, 2'-дезокси и 2'-ОМе.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая имеет длину 15-30 нуклеотидов; по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах антисмысловой цепи (считая от 5'-конца); где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); где средство на основе двухцепочечной iRNA содержит менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5% неприродных нуклеотидов или по сути не содержит неприродных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая имеет длину 15-30 нуклеотидов; по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах антисмысловой цепи (считая от 5'-конца); где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); где средство на основе двухцепочечной iRNA содержит более 80%, более 85%, более 95% или практически 100% природных нуклеотидов, например нуклеотидов, содержащих 2'-ОН, 2'-дезокси или 2'-ОМе.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающему приведение указанной клетки в контакт со средством на основе двухцепочечной iRNA, содержащим антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену; смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

Все вышеупомянутые варианты осуществления, относящиеся к липофильным фрагментам и их конъюгации со средством на основе двухцепочечной iRNA в первом аспекте настоящего изобретения, связанном со средством на основе двухцепочечной iRNA, применимы в этом аспекте настоящего изобретения, относящемся к способу снижения экспрессии целевого гена в клетке.

В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку, находящуюся за пределами печени.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии целевого гена у субъекта, предусматривающему введение субъекту средства на основе двухцепочечной iRNA, включающее приведение указанной клетки в контакт со средством на основе двухцепочечной iRNA, содержащим антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену; смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

Все вышеупомянутые варианты осуществления, относящиеся к липофильным фрагментам и их конъюгации со средством на основе двухцепочечной iRNA в первом аспекте настоящего изобретения, связанном со средством на основе двухцепочечной iRNA, применимы в этом аспекте настоящего изобретения, относящемся к способу снижения экспрессии целевого гена у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA вводят внепеченочным путем.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA вводят интратекальным путем. Путем интратекального введения средства на основе двухцепочечной iRNA с помощью данного способа можно обеспечить снижение экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга, например в коре головного мозга, мозжечке, шейном отделе спинного мозга, поясничном отделе спинного мозга и грудном отделе спинного мозга.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные целевые гены представляют собой APP, ATXN2, C9orf72, TARDBP, MAPT(Tau), HTT, SNCA, FUS, ATXN3, ATXN1, SCA1, SCA7, SCA8, MMeCP2, PRNP, SOD1, DMPK и TTR. Для снижения экспрессии данных целевых генов у субъекта, средство на основе двухцепочечной iRNA можно вводить интравитреально. Путем интравитреального введения средства на основе двухцепочечной iRNA способ может обеспечить снижение экспрессии целевого гена в ткани глаза.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, страдающего нарушением ЦНС, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного средства для RNAi, с осуществлением тем самым лечения субъекта. Двухцепочечное средство для RNAi содержит следующее: антисмысловая цепь, которая комплементарна целевому гену; смысловая цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

Все вышеупомянутые варианты осуществления, относящиеся к липофильным фрагментам и их конъюгации со средством на основе двухцепочечной iRNA в первом аспекте настоящего изобретения, связанном со средством на основе двухцепочечной iRNA, применимы в этом аспекте настоящего изобретения, относящемся к способу лечения субъекта с нарушением ЦНС. Иллюстративные нарушения ЦНС, которые можно подвергать лечению с помощью способа по настоящему изобретению, включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височную деменцию, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, спиноцеребеллярные, прионные нарушения и болезнь Лафора.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема, отображающая лиганды, такие как липофильные фрагменты, которые конъюгированы с siRNA во внутренних положениях смысловой или антисмысловой цепи (т.е. где-то в пределах последовательности siRNA).

На фиг. 2 представлена схема, отображающая лиганды, такие как липофильные фрагменты, которые конъюгированы с siRNA посредством линкеров или носителей на 3'- и/или 5'-концах смысловой или антисмысловой цепи.

На фиг. 3 представлена схема, отображающая лиганды, такие как липофильные фрагменты, которые конъюгированы с siRNA посредством биорасщепляемых линкеров.

На фиг. 4 представлен график, отображающий результаты сайленсинга гена бета-катенина (глазного CTNNB1) путем интравитреальной инъекции мышам различных иллюстративных конъюгатов siRNA.

На фиг. 5 представлен график, отображающий результаты сайленсинга mRNA SOD1 посредством однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA в кору головного мозга крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 6 представлен график, отображающий результаты сайленсинга mRNA SOD1 посредством однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA в мозжечок крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 7 представлен график, отображающий результаты сайленсинга mRNA SOD1 посредством однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA в шейный отдел спинного мозга крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 8 представлен график, отображающий результаты сайленсинга mRNA SOD1 посредством однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA в поясничный отдел спинного мозга крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 9 представлен график, отображающий результаты сайленсинга mRNA SOD1 посредством однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA в грудной отдел спинного мозга крыс линии Sprague Dawley.

На фиг. 10 показаны результаты свободного поглощения первичными гепатоцитами яванского макака () (без средства для трансфекции) для клеток, инкубированных с siRNA F12, модифицированных путем конъюгирования липофильного фрагмента (C16) в каждом положении антисмысловой цепи и смысловой цепи при концентрациях 2,5 и 250 нМ путем измерения уровней mRNA F12 через 24 ч с помощью RT-qPCR.

На фиг. 11 показаны результаты свободного поглощения первичными гепатоцитами яванского макака (PCH) (без средства для трансфекции) для клеток, инкубированных с siRNA F12, модифицированных путем конъюгирования липофильного фрагмента (C16) в каждом положении антисмысловой цепи и смысловой цепи при концентрациях 2,5 и 250 нМ путем измерения уровней mRNA F12 через 24 ч с помощью RT-qPCR.

На фиг. 12 показаны результаты относительной гидрофобности для каждого положения антисмысловой цепи и смысловой цепи дуплекса siRNA, модифицированного путем конъюгирования липофильного фрагмента (C16) в каждом положении антисмысловой цепи и смысловой цепи, определенных путем измерения несвязанной фракции с применением анализа сдвига электрофоретической подвижности после того, как каждый конъюгат siRNA инкубировали с сывороточным альбумином человека.

На фиг. 13A-13C продемонстрировано, что длительный сайленсинг mRNA SOD1 наблюдается во всех исследуемых областях головного и спинного мозга. На фиг. 13A показаны результаты сайленсинга mRNA SOD1 путем однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA крысам в области поясничного, грудного и шейного отделов спинного мозга соответственно. На фиг. 13B представлено схематическое изображение различных исследованных тканей, относящихся к ЦНС у крыс. На фиг. 13C показаны результаты сайленсинга mRNA SOD1 путем однократной интратекальной инъекции различных иллюстративных конъюгатов siRNA крысам в мозжечок, лобную кору и остальные участки мозга, соответственно.

На фиг. 14A, 14B показаны результаты сайленсинга гена β -катенина после однократной интратекальной дозы. На фиг. 14A показаны результаты сайленсинга гена β -катенина при введении различных иллюстративных конъюгатов siRNA крысам в участки поясничного, грудного и шейного отделов спинного мозга соответственно. На фиг. 14B показаны результаты сайленсинга гена β -катенина при введении различных иллюстративных конъюгатов siRNA крысам в мозжечок, лобную кору и остальные участки мозга, соответственно.

На фиг. 15A-15C показаны результаты сайленсинга гена SOD1 после однократного интратекального дозирования иллюстративных дуплексов siRNA у крыс, что указывает на более высокие уровни лекарственного средства и устойчивый сайленсинг, наблюдаемый в головном мозге, с применением конъюгата siRNA SOD1. На фиг. 15A показаны уровни конъюгированной siRNA в CSF по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA. На фиг. 15B показаны уровни конъюгированной siRNA в головном мозге по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA. На фиг. 15C показаны уровни конъюгированной siRNA в мозжечке по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA и контрольными уровнями siRNA.

На фиг. 16A, 16B показаны результаты сайленсинга гена SOD1 с различными химическими модификациями при различных дозах. На фиг. 16A показаны результаты сайленсинга гена SOD1 у крыс при введении в участки поясничного, грудного и шейного отделов спинного мозга, соответственно. На фиг. 16B показаны результаты сайленсинга гена SOD1 у крыс при введении в мозжечок, лобную кору и остальные участки мозга, соответственно.

На фиг. 17 показаны результаты уровней siRNA β -катенина после однократного интратекального (IT) дозирования иллюстративного дуплекса siRNA в различные участки отличным от человека приматам (NHP) на 31 день.

На фиг. 18 показаны результаты устойчивого генного сайленсинга mRNA β -катенина в различных тканях на 31 день.

На фиг. 19 показаны изображения, иллюстрирующие siRNA, распределенные по ЦНС у NHP, после однократного IT дозирования.

На фиг. 20 показаны изображения, иллюстрирующие конъюгаты siRNA, локализованные в нейронах, после однократного IT дозирования. MAP2 представляет собой нейрональный маркер.

На фиг. 21 показаны изображения, иллюстрирующие конъюгаты siRNA, локализованные в микроглии, после однократного IT дозирования. Iba1 представляет собой микроглиальный маркер.

На фиг. 22 показаны изображения, иллюстрирующие конъюгаты siRNA, локализованные в астроцитах, после однократного IT дозирования.

На фиг. 23 показан график, отображающий сравнение активности сайленсинга гена, наблюдаемой у крыс и NHP при дозе, масштабированной по компартменту.

На фиг. 24 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 3 мкг или 7,5 мкг.

На фиг. 25 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 7,5 мкг.

На фиг. 26 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после интравитреального введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 7,5 мкг.

Подробное описание

Авторы настоящего изобретения обнаружили, *inter alia*, что конъюгирование липофильного фрагмента с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи средства на основе двухцепочечной iRNA обеспечивает неожиданно хорошие результаты в отношении интравитреальной доставки *in vivo* и интратекальной доставки двухцепочечных iRNA, что обеспечивает в результате эффективное проникновение в ткани ЦНС и глазные ткани и эффективную интернализацию в клетки системы ЦНС и глазной системы.

В одном аспекте настоящего изобретения представлено средство на основе двухцепочечной iRNA, содержащее следующее: антисмысловая цепь, которая комплементарна целевому гену; смысловая цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, необязательно посредством линкера или носителя.

Термин "липофил" или "липофильный фрагмент" в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, проявляющему аффинность к липидам. Одним из способов охарактеризовать липофильность липофильного фрагмента является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой соотношение концентрации химического вещества в октанольной фазе к его концентрации в водной фазе двухфазной системы при равновесии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой лабораторно измеряемое свойство вещества. Однако это также можно спрогнозировать с применением коэффициентов, относящихся к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитываются с использованием первопринципных или эмпирических способов (см., например, Tetko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41:1407-21 (2001), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Это обеспечивает термодинамический критерий склонности вещества отдавать предпочтение неводной или масляной среде, а не воде (т.е. его гидрофильный/липофильный баланс). В принципе, химическое вещество является липофильным по характеру, когда его $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильный фрагмент характеризуется $\log K_{ow}$, превышающим 1, превышающим 1,5, превышающим 2, превышающим 3, превышающим 4, превышающим 5 или превышающим 10. Например, спрогнозировано, что $\log K_{ow}$ 6-аминогексанола составляет примерно 0,7. С применением того же способа спрогнозировано, 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 увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильного фрагмента.

В качестве альтернативы, гидрофобность средства на основе двухцепочечной iRNA, конъюгированного с одним или несколькими липофильными фрагментами, может быть измерена по его характеристикам связывания с белком. Например, несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы крови средства на основе двухцепочечной iRNA может быть определена как положительно коррелирующая с относительной гидрофобностью средства на основе двухцепочечной iRNA, которая может положительно коррелировать с активностью в отношении сайленсинга средства на основе двухцепочечной iRNA.

В одном варианте осуществления осуществляемый анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с применением белка, представляющего собой сывороточный альбумин человека. Примерный протокол этого анализа связывания подробно проиллюстрирован в примере 14. Гидрофобность средства на основе двухцепочечной iRNA, измеренная по фракции несвязанной siRNA 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 при улучшенной доставке siRNA *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним(ими) положением(ями) средства на основе двухцепочечной iRNA обеспечивает оптимальную гидрофобность для усиленной доставки siRNA *in vivo*.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, циклическое, такое как алициклическое, или полициклическое, такое как полиалициклическое соединение, такое как стероид (например, стерол), или линейный или разветвленный алифатический углеводород. Липофильный фрагмент, как правило, может включать углеводородную цепь, которая может быть циклической или ациклической. Углеводородная цепь может содержать различные заместители и/или один или несколько гетероатомов, таких как атом кислорода или азота. Такие липофильные алифатические фрагменты включают без ограничения насыщенные или ненасыщенные C_4 - C_{30} -углеводороды (например, C_6 - C_{18} -углеводороды), насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, виды воска (напри-

мер, сложные эфиры одноатомных спиртов и жирных кислот и диамиды жирных кислот), терпены (например, C₁₀-терпены, C₁₅-сесквитерпены, C₂₀-дитерпены, C₃₀-тритерпены и C₄₀-тетратерпены) и другие полиалициклические углеводороды. Например, липофильный фрагмент может содержать C₄-C₃₀-углеводородную цепь (например, C₄-C₃₀-алкил или -алкенил). В ином варианте осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₆-C₁₈-углеводородную цепь (например, линейный C₆-C₁₈-алкил или -алкенил). В одном варианте осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₁₆-углеводородную цепь (например, линейный C₁₆-алкил или -алкенил).

Липофильный фрагмент может быть присоединен к средству на основе iRNA любым способом, известным из уровня техники, в том числе посредством получения функционального группирования уже присутствующего в липофильном фрагменте или введенного в средство на основе iRNA, такого как гидроксильная группа (например, -CO-CH₂-OH). Функциональные группы, уже присутствующие в липофильном фрагменте или введенные в средство на основе iRNA, включают без ограничения гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

Конъюгация средства на основе iRNA и липофильного фрагмента может происходить, например, посредством образования простой эфирной или простой карбоксильной или карбамоиловой эфирной связи между гидроксильной и алкильной группой R-, алканоильной группой RCO- или замещенной карбамоильной группой RNHCO-. Алкильная группа R может быть циклической (например, циклогексил) или ациклической (например, с прямой или разветвленной цепью; и насыщенной или ненасыщенной). Алкильная группа R может представлять собой бутильную, пентильную, гексильную, гептильную, октильную, нонильную, децильную, ундецильную, додецильную, тридецильную, тетрадецильную, пентадецильную, гексадецильную, гептадецильную или октадецильную группу или тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол из азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

В другом варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой стероид, такой как стерол. Стероиды представляют собой полициклические соединения, содержащие пергидро-1,2-циклопентанофенантроновую кольцевую систему. Стероиды включают без ограничения желчные кислоты (например, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту и дегидрохолевую кислоту), кортизон, дигоксигенин, тестостерон, холестерин и катионные стероиды, такой как кортизон. "Производное холестерина" относится к соединению, полученному из холестерина, например, путем замены, добавления или удаления заместителей.

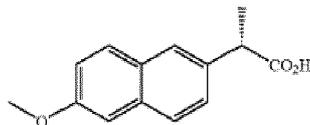
В другом варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой ароматический фрагмент. В этом контексте термин "ароматический" в широком смысле относится к моно- и полиароматическим углеводородам. Ароматические группы включают без ограничения C₆-C₁₄-арильные фрагменты, содержащие от одного до трех ароматических колец, которые могут быть обязательно замещены; "аралкильные" или "арилалкильные" группы, содержащие арильную группу, ковалентно связанную с алкильной группой, каждая из которых может независимо быть обязательно замещенной или незамещенной; и "гетероарильные" группы. Используемый в данном документе термин "гетероарил" относится к группам, имеющим от 5 до 14 кольцевых атомов, предпочтительно 5, 6, 9 или 10 кольцевых атомов; имеющим 6, 10 или 14 π-электронов, общих в циклическом массиве, и содержащим, помимо атомов углерода, от одного до приблизительно трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота (N), кислорода (O) и серы (S).

Используемая в данном документе "замещенная" алкильная, циклоалкильная, арильная, гетероарильная или гетероциклическая группа представляет собой группу, имеющую от одного до приблизительно четырех, предпочтительно от одного до приблизительно трех, более предпочтительно один или два неводородных заместителя. Подходящие заместители включают без ограничения галоген, гидроксил, нитро, галогеналкил, алкил, алкарил, арил, аралкил, алкокси, арилокси, амино, ациламино, алкилкарбамоил, арилкарбамоил, аминокалкил, алкоксикарбонил, карбокси, гидроксиалкил, алкансульфонил, аренсульфонил, алкансульфонамидо, аренсульфонамидо, аралкилсульфонамидо, алкилкарбонил, ацилокси, циано и уреидо группы.

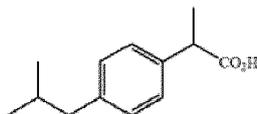
В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой аралкильную группу, например 2-арилпропаноильный фрагмент. Структурные особенности аралкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильный фрагмент связывался с по меньшей мере одним белком *in vivo*. В определенных вариантах осуществления структурные особенности аралкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильный фрагмент связывался с сывороточными, сосудистыми или клеточными белками. В определенных вариантах осуществления структурные особенности аралкильной группы способствуют связыванию с альбумином, иммуноглобулином, липопротеином, α-2-макроглобулином или α-1-гликопротеином.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой напроксен или структурное

производное напроксена. Методики синтеза напроксена можно найти в патенте США № 3904682 и патенте США № 4009197, которые тем самым включены посредством ссылки в полном объеме. Напроксен имеет химическое название (S)-6-метокси- α -метил-2-нафталинуксусная кислота, а его структура представляет собой



В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой ибупрофен или структурное производное ибупрофена. Методики синтеза ибупрофена можно найти в патенте США № 3228831, который тем самым включен посредством ссылки в полном объеме. Структура ибупрофена представляет собой



Дополнительные иллюстративные аралкильные группы проиллюстрированы в патенте США № 7626014, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В другом варианте осуществления подходящие липофильные фрагменты включают липид, холестерин, ретиновую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексанола, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, ибупрофен, напроксен, диметокситритил или феноксазин.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой C_6 - C_{30} -кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексановую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т.д.) или C_6 - C_{30} -спирт (например, гексанола, гептанола, октанола, нонанола, деканола, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанола, ретинола, витамин Е, холестерин и т.п.).

В определенных вариантах осуществления более одного липофильного фрагмента можно включить в средство на основе двухцепочечной iRNA, в частности, когда липофильный фрагмент имеет низкую липофильность или гидрофобность. В одном варианте осуществления два или более липофильных фрагмента включены в одну и ту же цепь средства на основе двухцепочечной iRNA. В одном варианте осуществления каждая цепь средства на основе двухцепочечной iRNA имеет один или несколько включенных липофильных фрагментов. В одном варианте осуществления два или более липофильных фрагментов включены в одно и то же положение (т.е. при одном и том же нуклеиновом основании, одном и том же сахарном фрагменте или одной и той же межнуклеозидной связи) средства на основе двухцепочечной iRNA. Это может быть достигнуто, например, путем конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством разветвленного линкера, и/или конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством одного или нескольких линкеров, при помощи одного или нескольких линкеров, последовательно связывающих липофильные фрагменты.

Липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством на основе iRNA посредством прямого присоединения к рибосахару средства на основе iRNA. В качестве альтернативы, липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством линкера или носителя.

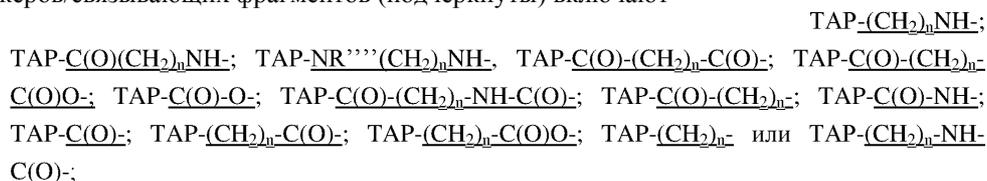
В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством на основе iRNA посредством одного или нескольких линкеров (связывающих фрагментов).

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол из азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат. Некоторые иллюстративные связи показаны на фиг. 1, в примерах 2, 3, 5, 6 и 7.

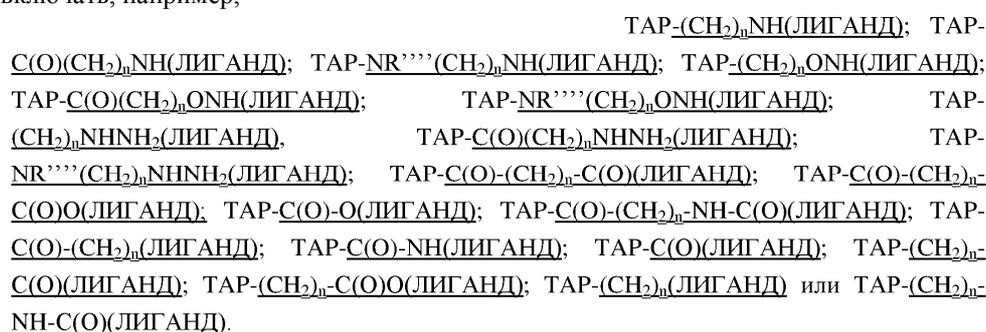
Линкеры/связывающие фрагменты.

Линкеры/связывающие фрагменты соединены с липофильным фрагментом в "связывающей точке присоединения (TAP)". Линкеры/связывающие фрагменты могут включать любой C_1 - C_{100} -углеродсодержащий фрагмент (например, C_1 - C_{75} , C_1 - C_{50} , C_1 - C_{20} , C_1 - C_{10} ; C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9

или C₁₀), а также могут иметь по меньшей мере один атом азота. В определенных вариантах осуществления атом азота образует часть концевой amino- или амидо (NHС(O)-) группы на линкере/связывающем фрагменте, что может служить точкой соединения для липофильного фрагмента. Неограниченные примеры линкеров/связывающих фрагментов (подчеркнуты) включают



в которых n составляет 1-20 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20), и R'''' представляет собой C₁-C₆-алкил. Предпочтительно, n равняется 5, 6 или 11. В других вариантах осуществления атом азота может образовывать часть концевой оксиаминогруппы, например -ONH₂, или гидразиногруппы, -NHNH₂. Линкер/связывающий фрагмент необязательно может быть замещен, например гидрокси, алкокси, пергалогеналкилом, и/или необязательно подвергается вставке одного или нескольких дополнительных гетероатомов, например N, O или S. Предпочтительные связывающие лиганды могут включать, например,



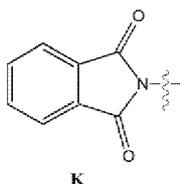
В некоторых вариантах осуществления линкеры/связывающие фрагменты с концевыми аминогруппами (например, NH₂, ONH₂, NH₂NH₂) могут образовывать имино-связь (т.е. C=N) с лигандом. В некоторых вариантах осуществления линкеры/связывающие фрагменты с концевыми аминогруппами (например, NH₂, ONH₂, NH₂NH₂) можно ацилировать, например с помощью C(O)CF₃.

В некоторых вариантах осуществления линкер/связывающий фрагмент может на конце содержать меркаптогруппу (т.е. SH) или олефин (например, CH=CH₂).

Например, связывающий фрагмент может представлять собой TAP-(CH₂)_n-SH, TAP-C(O)(CH₂)_n-SH, TAP-(CH₂)_n-(CH=CH₂) или TAP-C(O)(CH₂)_n-(CH=CH₂), где n может быть таким, как описано в других частях данного документа. Связывающий фрагмент необязательно может быть замещен, например гидрокси, алкокси, пергалогеналкилом, и/или необязательно подвергнут вставке одного или нескольких дополнительных гетероатомов, например N, O или S. Двойная связь может быть в цис-положении или транс-положении или E или Z.

В других вариантах осуществления линкер/связывающий фрагмент может включать электрофильный фрагмент, предпочтительно в концевом положении линкера/связывающего фрагмента. Примеры электрофильных фрагментов включают, например, альдегид, алкилгалогенид, мезилат, тозилат, нозилат или брозилат, или сложный эфир активированной карбоновой кислоты, например сложный эфир NHS, или сложный эфир пентафторфенила. Предпочтительные линкеры/связывающие фрагменты (подчеркнуты) включают TAP-(CH₂)_n-CHO; TAP-C(O)(CH₂)_n-CHO или TAP-NR''''(CH₂)_n-CHO, в которых n составляет 1-6, и R'''' представляет собой C₁-C₆-алкил; или TAP-(CH₂)_n-C(O)ONHS; TAP-C(O)(CH₂)_n-C(O)ONHS или TAP-NR''''(CH₂)_n-C(O)ONHS, в которых n составляет 1-6, и R'''' представляет собой C₁-C₆-алкил; TAP-(CH₂)_n-C(O)OC₆F₅; TAP-C(O)(CH₂)_n-C(O)OC₆F₅ или TAP-NR''''(CH₂)_n-C(O)OC₆F₅, в которых n составляет 1-11, и R'''' представляет собой C₁-C₆-алкил; или -(CH₂)_n-CH₂LG; TAP-C(O)(CH₂)_n-CH₂LG или TAP-NR''''(CH₂)_n-CH₂LG, в которых n может представлять собой любое из описанного в любом месте в данном документе, и R'''' представляет собой C₁-C₆-алкил (LG может представлять собой уходящую группу, например галогенид, мезилат, тозилат, нозилат, брозилат). Связывание может быть выполнено путем соединения нуклеофильной группы лиганда, например тиоловой или аминогруппы, с электрофильной группой на связывающем фрагменте.

В других вариантах осуществления может быть желательно, чтобы мономер включал фталимидогруппу (K) в концевом положении линкера/связывающего фрагмента.



В других вариантах осуществления другие защищенные аминокетильные группы могут находиться в концевом положении линкера/связывающего фрагмента, например аллоксимин, монометокситриетил (ММТ), трифторацетил, Fmoc или арилсульфонил (например, арильная часть может быть орто-нитрофенильной или орто-, пара-динитрофенильной).

Любой из линкеров/связывающих фрагментов, описанных в данном документе, может дополнительно включать одну или несколько дополнительных связывающих групп, например $-O-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n-$, $-SS-$, $-(CH_2)_n-$ или $-(CH=CH)-$.

Расщепляемые линкеры/связывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый посредством окислительно-восстановительной реакции, линкер, расщепляемый кислотой, линкер, расщепляемый эстеразой, линкер, расщепляемый фосфатазой, или линкер, расщепляемый пептидазой.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый при восстановлении (например, дисульфидная группа).

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый кислотой (например, гидразоновая группа, сложноэфирная группа, ацетальная группа или кетальная группа).

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый эстеразой (например, сложноэфирная группа).

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый фосфатазой (например, фосфатная группа).

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из линкеров/связывающих фрагментов может представлять собой линкер, расщепляемый пептидазой (например, пептидная группа).

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

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к pH. pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как средний показатель pH внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым pH, составляющим около 5,0. Некоторые связывающие фрагменты будут иметь группу связывания, которая расщепляется при предпочтительном pH, освобождая тем самым средство на основе iRNA от лиганда (например, нацеливающего или проникающего для клетки лиганда, такого как холестерин) внутри клетки или в желаемом компартменте клетки.

Химическое соединение (например, связывающая группа), которое связывает лиганд со средством на основе iRNA, может включать дисульфидную связь. Когда комплекс средство на основе iRNA/лиганд попадает в клетку за счет эндоцитоза, кислая среда эндосомы вызывает разрыв дисульфидной связи, освобождая тем самым средство на основе iRNA от лиганда (Quintana et al., Pharm Res. 19:1310-1316, 2002; Pati et al., Curr. Opin. Curr. Biol. 6:466-471, 2002). Лиганд может представлять собой нацеливающий лиганд или второе терапевтическое средство, которое может дополнять терапевтические эффекты средства на основе iRNA.

Связывающий фрагмент может включать линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип линкерной группы, включенной в связывающий фрагмент, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию средством на основе iRNA. Например, средство на основе iRNA, которое нацеливает mRNA в клетках печени, может быть конъюгировано со связывающим фрагментом,

который включает сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, связывающий фрагмент будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Расщепление связывающего фрагмента освобождает средство на основе iRNA от лиганда, который прикреплен к дистальному концу связывающего фрагмента, тем самым потенциально повышая сайленсинговую активность средства на основе iRNA. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

Связывающие фрагменты, которые содержат пептидные связи, могут быть конъюгированы со средствами на основе iRNA, нацеленными на типы клеток, богатые пептидазами, например клетки печени и синовиоциты. Например, средство на основе iRNA, нацеленное на синовиоциты, например для лечения воспалительного заболевания (например, ревматоидного артрита), может быть конъюгировано со связывающим фрагментом, содержащим пептидную связь.

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценить путем тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью, например тканью, контакту с которой средство на основе iRNA будет подвергаться при введении субъекту. Таким образом можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условиями, при этом первое выбирают так, чтобы оно характеризовало расщепление в целевой клетке, а второе выбирают так, чтобы оно характеризовало расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно выполнить первоначальные измерения в условиях бесклеточной системы или в условиях культуры и подтвердить путем дальнейших измерений на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

Линкерные группы, расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций.

Один класс расщепляемых линкерных групп представляет собой расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерные группы, которые расщепляются при восстановлении или окислении. Примером линкерной группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли кандидатная расщепляемая линкерная группа подходящей "расщепляемой при восстановлении линкерной группой" или, например, подходящей для применения с определенным фрагментом на основе iRNA и определенным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидата можно оценить при инкубировании с дитиотрептолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных из уровня техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например в целевой клетке. Кандидаты также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки крови. В предпочтительных вариантах осуществления самое большее 10% кандидатных соединений расщепляются в крови. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются в по меньшей мере 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с применением стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Фосфатные расщепляемые линкерные группы.

Фосфатные линкерные группы расщепляются под действием средств, которые разрушают или осуществляют гидролиз фосфатной группы. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами фосфатных линкерных групп являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

Расщепляемые кислотой линкерные группы.

Расщепляемые кислотой линкерные группы представляют собой линкерные группы, которые расщепляются в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде при pH приблизительно 6,5 или ниже (например, при-

близительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже) или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке расщепляющую среду для расщепляемых кислотами линкерных групп могут обеспечить специфические органеллы, характеризующиеся низким pH, такие как эндосомы и лизосомы. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают в себя без ограничения гидразоны, кетали, ацетали, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут характеризоваться общей формулой $-C=NN-$, $C(C)C$ или $-OC(O)$. Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к атому кислорода сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

Сложноэфирные линкерные группы.

Сложноэфирные линкерные группы расщепляются в клетках под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают в себя без ограничения сложноэфирные производные алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

Пептидные расщепляемые группы.

Пептидные линкерные группы расщепляются в клетках под действием ферментов, таких как пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают в себя амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает в себя амидную функциональную группу полностью. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой $-NHCHR^1C(O)NHCHR^2C(O)-$, где R^1 и R^2 представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

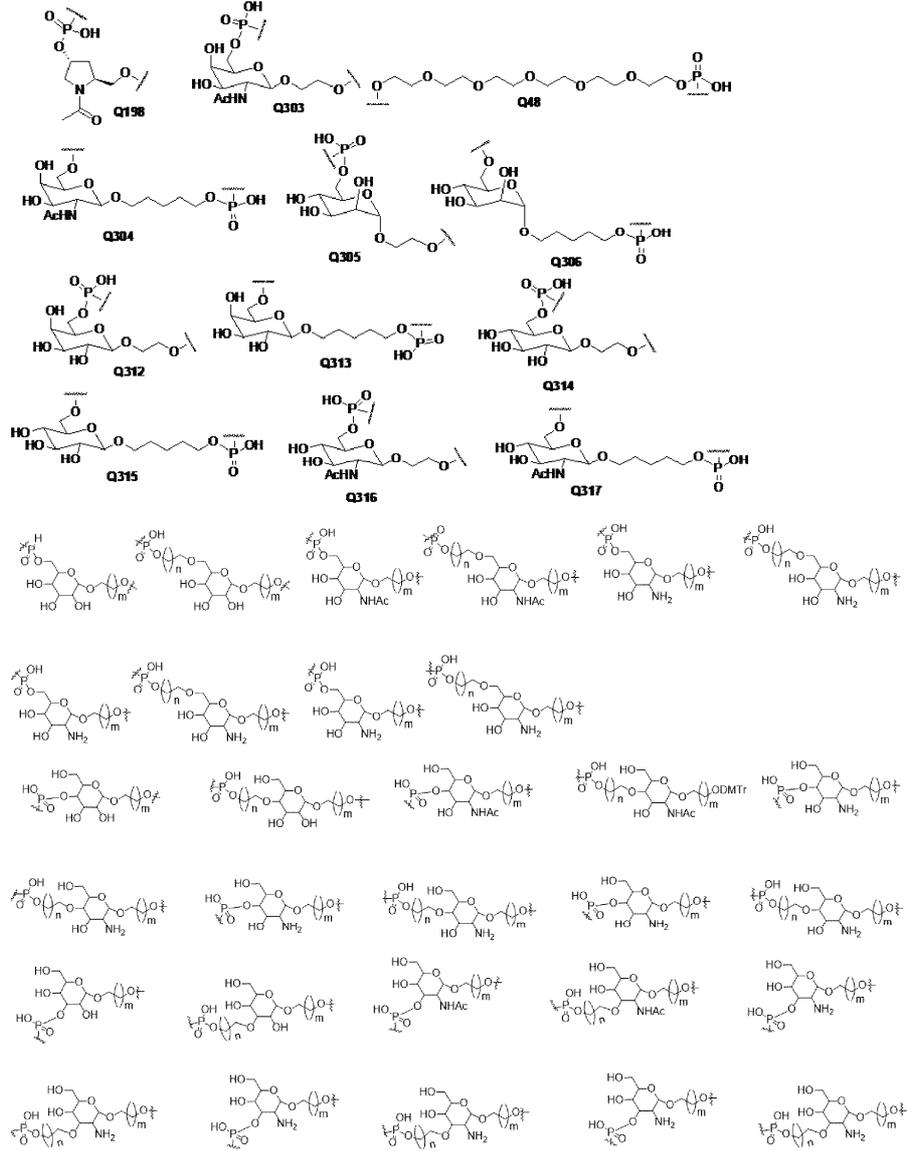
Биорасщепляемые линкеры/связывающие фрагменты.

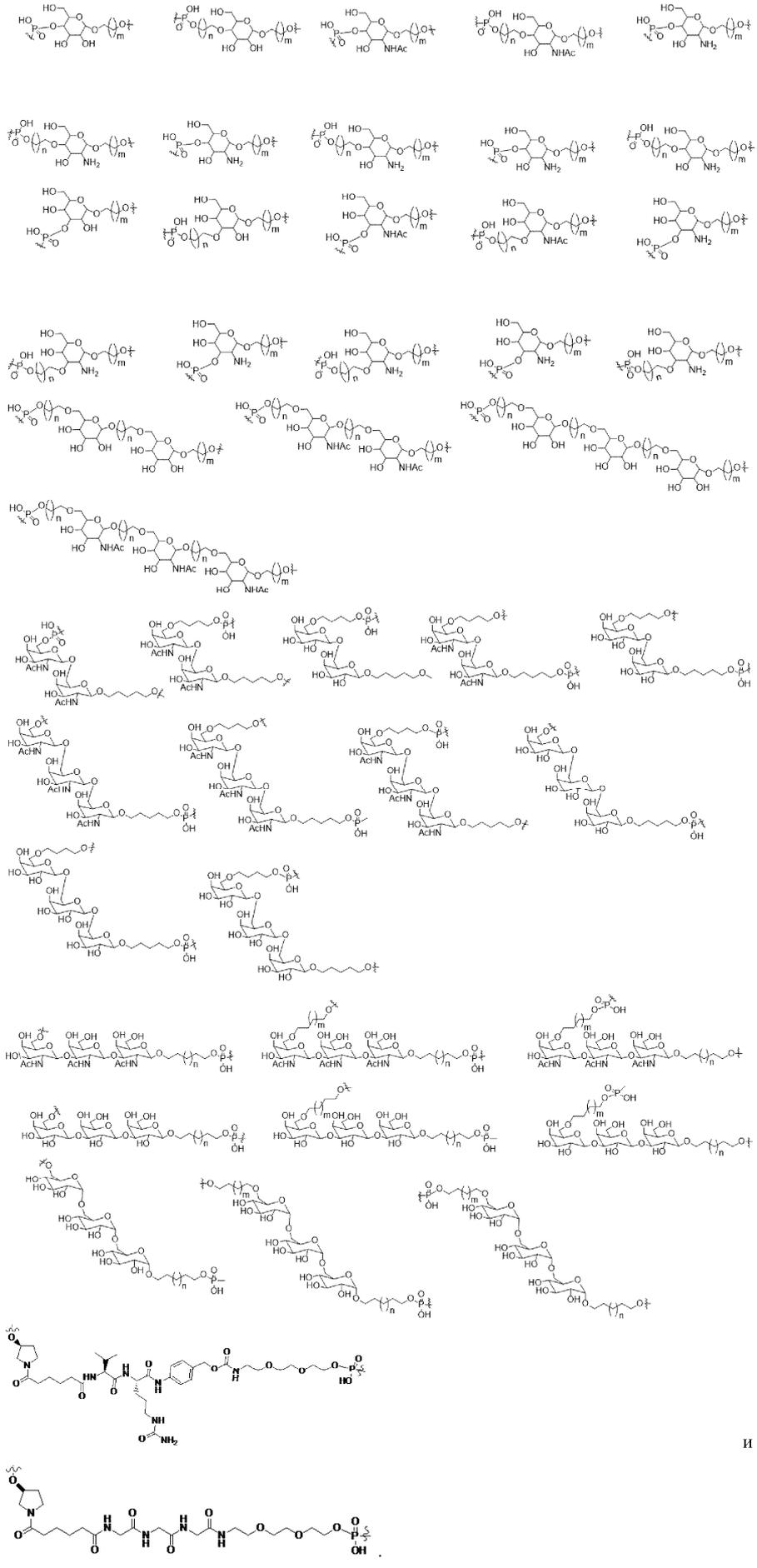
Линкеры могут также включать биорасщепляемые линкеры, которые представляют собой нуклеотидные и отличные от нуклеотидных линкеры или их комбинации, которые соединяют две части молекулы, например одну или обе цепи двух отдельных молекул siRNA, с получением бис(siRNA). В некоторых вариантах осуществления простое электростатическое взаимодействие или стэкинг-взаимодействие между двумя отдельными siRNA может представлять линкер. Отличные от нуклеотидных линкеры включают связывающие фрагменты или линкеры, полученные из моносахаридов, дисахаридов, олигосахаридов и их производных, алифатических, алициклических, гетероциклических, и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из линкеров (связывающих фрагментов) представляет собой биорасщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, а также маннозы и их комбинаций.

В одном варианте осуществления биорасщепляемый углеводный линкер может иметь от 1 до 10 сахаридных единиц, которые имеют по меньшей мере одну аномерную связь, способную соединять два звена siRNA. Когда присутствуют два или более сахара, эти звенья могут быть связаны посредством 1-3, 1-4 или 1-6 сахарных связей или посредством алкильных цепей.

Примеры биорасщепляемых линкеров включают





И

Дополнительные иллюстративные биорасщепляемые линкеры проиллюстрированы на схемах 28-30.

Дополнительное обсуждение биорасщепляемых линкеров можно найти в поданной согласно PCT заявке № PCT/US18/14213, озаглавленной "Endosomal Cleavable Linkers", поданной 18 января 2018 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Носители.

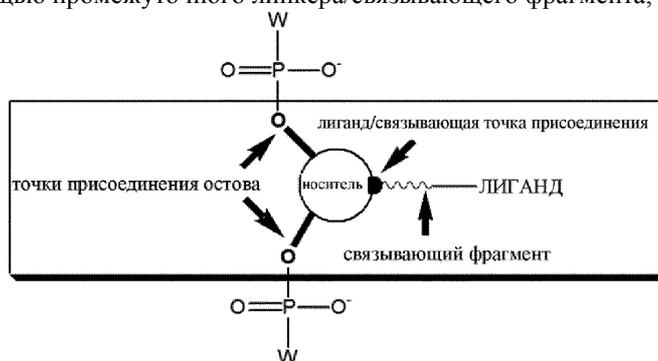
В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе iRNA при помощи носителя, который заменяет один или несколько нуклеотидов.

Носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. В одном варианте осуществления циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. В одном варианте осуществления ациклическая группа представляет собой фрагмент на основании остова из серинола или остова из диэтанолamina.

В некоторых вариантах осуществления носитель заменяет один или несколько нуклеотидов во внутреннем(их) положении(ях) средства на основе двухцепочечной iRNA.

В других вариантах осуществления носитель заменяет нуклеотиды на терминальном конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления носитель заменяет концевой нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи, тем самым функционируя в качестве концевого колпачка, защищающего 3'-конец смысловой цепи. В одном варианте осуществления носитель представляет собой циклическую группу, содержащую амин, например носитель может представлять собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил.

Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, обозначают в данном документе как субъединицу с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Носитель может быть циклическим или ациклическим фрагментом и включать две "точки присоединения к остову" (например, гидроксильные группы) и лиганд (например, липофильный фрагмент). Липофильный фрагмент может быть непосредственно присоединен к носителю или опосредованно присоединен к носителю с помощью промежуточного линкера/связывающего фрагмента, который описан выше.

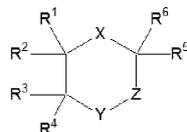


Конъюгированная с лигандом мономерная субъединица может представлять собой 5'- или 3'-концевую субъединицу молекулы iRNA, т.е. одна из двух групп "W" может представлять собой гидроксильную группу, а другая группа "W" может представлять собой цепь из двух или более немодифицированных или модифицированных рибонуклеотидов. В качестве альтернативы, конъюгированная с лигандом мономерная субъединица может занимать внутреннее положение, и обе группы "W" могут представлять собой один или несколько немодифицированных или модифицированных рибонуклеотидов. В средстве на основе iRNA может присутствовать более одной конъюгированной с лигандом мономерной субъединицы.

Мономеры на основе замещения сахара, например мономеры, конъюгированные с лигандом (циклические).

Циклические мономеры на основе замещения сахара, например мономеры, конъюгированные с лигандом на основе замещения сахара, также упоминаются в данном документе как мономерные соединения RRMS. Носители могут иметь общую формулу (LCM-2), представленную ниже (в этой структуре предпочтительные точки присоединения к остову могут быть выбраны из R^1 или R^2 ; R^3 или R^4 или R^9 и R^{10} , если Y представляет собой CR^9R^{10} (выбирают два положения для получения двух точек присоединения к остову, например R^1 и R^4 или R^4 и R^9). Предпочтительные связывающие точки присоединения включают R^7 ; R^5 или R^6 , если X представляет собой CH_2 . Носители описаны ниже как объекты, которые могут быть включены в цепь. Таким образом, понятно, что структуры также охватывают ситуации, в которых одна (в случае концевой позиции) или две (в случае внутреннего положения) из точек присоединения, например R^1 или R^2 ; R^3 или R^4 или R^9 или R^{10} (когда Y представляет собой CR^9R^{10}), связаны с

фосфатным или модифицированным фосфатным, например с серосодержащим, остовом. Например, одна из названных выше групп R может представлять собой $-\text{CH}_2-$, где одна связь присоединена к носителю, а другая к атому остова, например атому кислорода, образующему связь, или центральному атому фосфора.



(LCM-2),

где X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$, NR^7 или CH_2 ;

Y представляет собой NR^8 , O, S, CR^9R^{10} ;

Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$ или отсутствует;

каждый из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^9 и R^{10} независимо представляет собой H, OR^a или $(\text{CH}_2)_n\text{OR}^b$, при условии, что по меньшей мере два из R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^9 и R^{10} представляют собой OR^a и/или $(\text{CH}_2)_n\text{OR}^b$;

каждый из R^5 , R^6 , R^{11} и R^{12} независимо представляет собой лиганд, H, C_1 - C_6 -алкил, необязательно замещенный 1-3 R^{13} , или $\text{C}(\text{O})\text{NHR}^7$; или R^5 и R^{11} вместе представляют собой C_3 - C_8 -циклоалкил, необязательно замещенный R^{14} ;

R^7 может представлять собой лиганд, например R^7 может представлять собой R^d , или R^7 может представлять собой лиганд, опосредованно связанный с носителем, например через связующий фрагмент, например C_1 - C_{20} -алкил, замещенный NR^cR^d , или C_1 - C_{10} -алкил, замещенный $\text{NHC}(\text{O})\text{R}^d$;

R^8 представляет собой H или C_1 - C_6 -алкил;

R^{13} представляет собой гидрокси, C_1 - C_6 -алкокси или галоген;

R^{14} представляет собой NR^cR^7 ;

R^{15} представляет собой C_1 - C_6 -алкил, необязательно замещенный циано, или C_2 - C_6 -алкенил;

R^{16} представляет собой C_1 - C_{10} -алкил;

R^{17} представляет собой жидкий или твердофазный реагент-носитель;

L представляет собой $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_q\text{C}(\text{O})-$ или $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_q\text{S}-$;

R^a представляет собой защитную группу, например AlR_3 ; (например, диметокситритильная группа) или $\text{Si}(\text{X}^{5'})_2(\text{X}^{5''})$, в которой $(\text{X}^{5'})$, $(\text{X}^{5''})$, а также $(\text{X}^{5''})$ такие как описано в любом месте в данном документе;

R^b представляет собой $\text{P}(\text{O})(\text{O})\text{H}$, $\text{P}(\text{OR}^{15})\text{N}(\text{R}^{16})_2$ или L-R^{17} ;

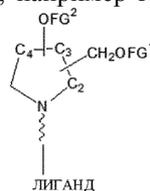
R^c представляет собой H или C_1 - C_6 -алкил;

R представляет собой H или лиганд;

каждый Ag независимо представляет собой C_6 - C_{10} -арил, необязательно замещенный C_1 - C_4 -алкокси; n составляет 1-4; а q составляет 0-4.

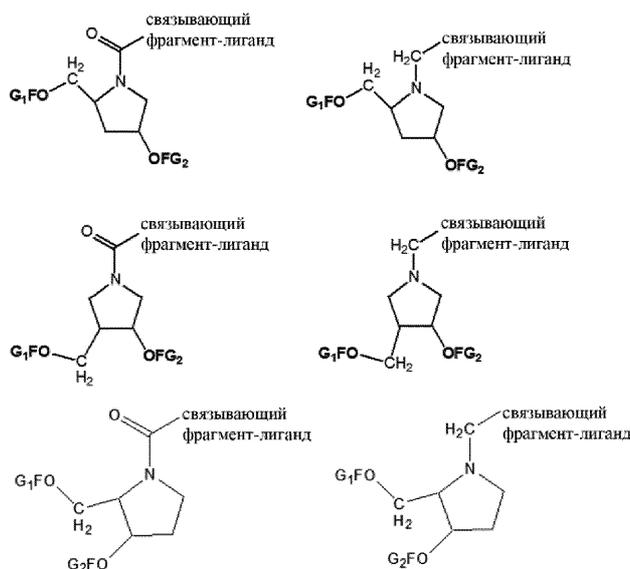
Примеры носителей включают те, в которых, например, X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ или NR^7 , Y представляет собой CR^9R^{10} , а Z отсутствует; или X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ или NR^7 , Y представляет собой CR^9R^{10} , а Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$; или X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ или NR^7 , Y представляет собой NR^8 , а Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$; или X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ или NR^7 , Y представляет собой O, а Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$; или X представляет собой CH_2 ; Y представляет собой CR^9R^{10} ; Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$, а R^5 и R^{11} вместе образуют C_6 -циклоалкил (H, z=2) или индановую кольцевую систему, например X представляет собой CH_2 ; Y представляет собой CR^9R^{10} ; Z представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$, а R^5 и R^{11} вместе образуют C_5 -циклоалкил (H, z=1).

В определенных вариантах осуществления носитель может быть основан на пирролиновой кольцевой системе или 4-гидроксипролиновой кольцевой системе, например X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$

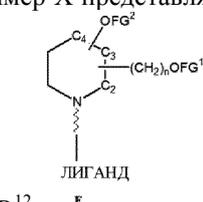


или NR^7 , Y представляет собой CR^9R^{10} , а Z отсутствует (D). OFG^1 предпочтительно присоединен к первичному атому углерода, например к экзоциклической алкиленовой группе, например к метиленовой группе, соединенной с одним из атомов углерода в пятичленном кольце ($-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ в D). OFG^2 предпочтительно присоединен непосредственно к одному из атомов углерода в пятичленном кольце ($-\text{OFG}^2$ в D). Для носителей на основе пирролина $-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-2, а OFG^2 может быть присоединен к C-3; или $-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-3, а OFG^2 может быть присоединен к C-4. В определенных вариантах осуществления CH_2OFG^1 и OFG^2 могут быть геминально замещены одним из указанных выше атомов углерода. Для носителей на основе 3-гидроксипролина $-\text{CH}_2\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-2, а OFG^2 может быть присоединен к C-4. Таким образом, моно-

меры на основе пирролина и 4-гидроксипролина могут содержать связи (например, углерод-углеродные связи), при этом вращение связи ограничено относительно этой конкретной связи, например ограничение, возникающее из-за наличия кольца. Таким образом, CH_2OFG^1 и OFG^2 могут быть в цис- или транс-положении по отношению друг к другу в любой из пар, обозначенных выше. Соответственно, все цис/транс-изомеры явно включены. Мономеры также могут содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров и диастереомерных смесей. Все такие изомерные формы мономеров явно включены (например, центры, несущие CH_2OFG^1 и OFG^2 , могут оба иметь R-конфигурацию; или оба иметь S-конфигурацию; или один центр может иметь R-конфигурацию, а другой центр может иметь S-конфигурацию и *vice versa*). Связывающая точка присоединения предпочтительно представляет собой атом азота. Предпочтительные примеры носителя D включают следующее:



В определенных вариантах осуществления носитель может быть основан на пиперидиновой кольцевой системе (E), например X представляет собой $\text{N}(\text{CO})\text{R}^7$ или NR^7 , Y представляет собой CR^9R^{10} , а Z

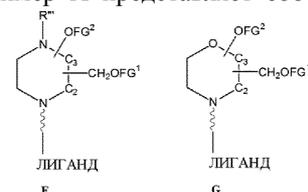


представляет собой $\text{CR}^{11}\text{R}^{12}$.

OFG^1 предпочтительно присоединен к первичному атому углерода, например к экзоциклической алкиленовой группе, например к метиленовой группе ($n=1$) или этиленовой группе ($n=2$), соединенной с одним из атомов углерода в шестичленном кольце [$-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ в E]. OFG^2 предпочтительно присоединен непосредственно к одному из атомов углерода в шестичленном кольце ($-\text{OFG}^2$ в E). $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ и OFG^2 могут быть расположены геминально на кольце, т.е. обе группы могут быть присоединены к одному и тому же атому углерода, например к C-2, C-3 или C-4. В качестве альтернативы, $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ и OFG^2 могут быть расположены вицинально на кольце, т.е. обе группы могут быть присоединены к соседним атомам углерода кольца, например $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-2, а OFG^2 может быть присоединен к C-3; $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-3, а OFG^2 может быть присоединен к C-2; $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-3, а OFG^2 может быть присоединен к C-4; или $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ может быть присоединен к C-4, а OFG^2 может быть присоединен к C-3. Таким образом, мономеры на основе пиперидина могут содержать связи (например, углерод-углеродные связи), при этом вращение связи ограничено относительно этой конкретной связи, например ограничение, возникающее из-за наличия кольца. Таким образом, $-(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ и OFG^2 могут быть в цис-положении или транс-положении по отношению друг к другу в любой из пар, обозначенных выше. Соответственно, явно включены все цис/транс-изомеры. Мономеры также могут содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров и диастереомерных смесей. Все такие изомерные формы мономеров явно включены (например, центры, несущие CH_2OFG^1 и OFG^2 , могут оба иметь R-конфигурацию; или оба иметь S-конфигурацию; или один центр может иметь R-конфигурацию, а другой центр может иметь S-конфигурацию и *vice versa*).

Связывающая точка присоединения предпочтительно представляет собой атом азота.

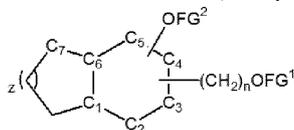
В определенных вариантах осуществления носитель может быть основан на пиперазиновой кольцевой системе (F), например X представляет собой $N(CO)R^7$ или NR^7 , Y представляет собой NR^8 , и Z представляет собой $CR^{11}R^{12}$, или морфолиновой кольцевой системе (G), например X представляет собой



$N(CO)R^7$ или NR^7 , Y представляет собой O, и Z представляет собой $CR^{11}R^{12}$.

OFG^1 предпочтительно присоединен к первичному атому углерода, например к экзоциклической алкиленовой группе, например к метиленовой группе, связанной с одним из атомов углерода в шестичленном кольце ($-CH_2OFG^1$ в F или G). OFG^2 предпочтительно присоединен непосредственно к одному из атомов углерода в шестичленных кольцах ($-OFG^2$ в F или G). И для F, и для G $-CH_2OFG^1$ может быть присоединен к C-2, а OFG^2 может быть присоединен к C-3; или vice versa. В определенных вариантах осуществления CH_2OFG^1 и OFG^2 могут быть замещены геминально по отношению к одному из указанных выше атомов углерода. Следовательно, мономеры на основе пиперазина и морфолина могут содержать связи (например, углерод-углеродные связи), при этом вращение связей ограничено относительно этой конкретной связи, например ограничение, возникающее ввиду наличия кольца. Таким образом, CH_2OFG^1 и OFG^2 могут быть в цис-положении или транс-положении по отношению друг к другу в любой из пар, обозначенных выше. Соответственно, явно включены все цис/транс-изомеры. Мономеры также могут содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров и диастереомерных смесей. Все такие изомерные формы мономеров явно включены (например, центры, несущие CH_2OFG^1 и OFG^2 , могут оба иметь R-конфигурацию; или оба иметь S-конфигурацию; или один центр может иметь R-конфигурацию, а другой центр может иметь S-конфигурацию и vice versa). R'' может представлять собой, например, C₁-C₆-алкил, предпочтительно CH₃. Связывающая точка присоединения предпочтительно представляет собой атом азота как в F, так и в G.

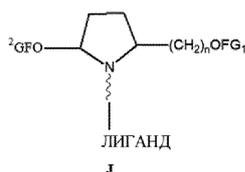
В определенных вариантах осуществления носитель может быть основан на декалиновой кольцевой системе, например X представляет собой CH₂; Y представляет собой CR^9R^{10} ; Z представляет собой $CR^{11}R^{12}$, а R⁵ и R¹¹ вместе образуют C₆-циклоалкил (H, z=2), или индановой кольцевой системе, например X представляет собой CH₂; Y представляет собой CR^9R^{10} ; Z представляет собой $CR^{11}R^{12}$, а R⁵ и R¹¹ вме-



сте образуют C₆-циклоалкил (H, z=1).

OFG^1 предпочтительно присоединен к первичному атому углерода, например к экзоциклической метиленовой группе (n=1) или этиленовой группе (n=2), связанной с одним из C-2, C-3, C-4 или C-5 [$-(CH_2)_nOFG^1$ в H]. OFG^2 предпочтительно присоединен непосредственно к одному из C-2, C-3, C-4 или C-5 ($-OFG^2$ в H). $-(CH_2)_nOFG^1$ и OFG^2 могут быть расположены геминально на кольце, т.е. обе группы могут быть присоединены к одному и тому же атому углерода, например к C-2, C-3, C-4 или C-5. В качестве альтернативы, $-(CH_2)_nOFG^1$ и OFG^2 могут быть расположены вицинально на кольце, т.е. обе группы могут быть присоединены к соседним атомам углерода кольца, например $-(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-2, а OFG^2 может быть присоединен к C-3; $-(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-3, а OFG^2 может быть присоединен к C-2; $-(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-3, а OFG^2 может быть присоединен к C-4; или $(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-4, а OFG^2 может быть присоединен к C-3; $-(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-4, а OFG^2 может быть присоединен к C-5; или $-(CH_2)_nOFG^1$ может быть присоединен к C-5, а OFG^2 может быть присоединен к C-4. Таким образом, мономеры на основе декалина или индана могут содержать связи (например, углерод-углеродные связи), при этом вращение связей ограничено относительно этой конкретной связи, например ограничение, возникающее из-за наличия кольца. Таким образом, $-(CH_2)_nOFG^1$ и OFG^2 могут быть в цис-положении или транс-положении по отношению друг к другу в любой из пар, обозначенных выше. Соответственно, явно включены все цис/транс-изомеры. Мономеры также могут содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров и диастереомерных смесей. Все такие изомерные формы мономеров явно включены (например, центры, несущие CH_2OFG^1 и OFG^2 , могут оба иметь R-конфигурацию; или оба иметь S-конфигурацию; или один центр может иметь R-конфигурацию, а другой центр может иметь S-конфигурацию и vice versa). В предпочтительном варианте осуществления заместители у C-1 и C-6 находятся в транс-положении по отношению друг к другу. Связывающая точка присоединения предпочтительно представляет собой C-6 или C-1.

Другие носители могут предусматривать носители на основе 3-гидроксипролина (J).

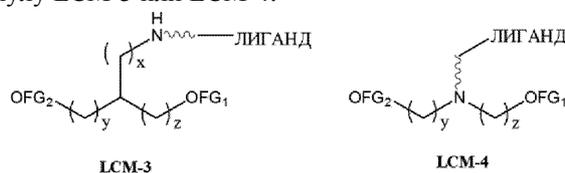


Таким образом, $(\text{CH}_2)_n\text{OFG}^1$ и OFG^2 могут быть в цис-положении или транс-положении по отношению друг к другу. Соответственно, явно включены все цис/транс-изомеры. Мономеры также могут содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, встречаться в виде рацематов и рацемических смесей, отдельных энантиомеров, индивидуальных диастереомеров и диастереомерных смесей. Все такие изомерные формы мономеров явно включены (например, центры, несущие CH_2OFG^1 и OFG^2 , могут оба иметь R-конфигурацию; или оба иметь S-конфигурацию; или один центр может иметь R-конфигурацию, а другой центр может иметь S-конфигурацию и *vice versa*). Связывающая точка присоединения предпочтительно представляет собой атом азота.

Подробности о более типичных циклических носителях на основе замещения сахара можно найти в патентах США №№ 7745608 и 8017762, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Мономеры на основе замещения сахара (ациклические).

Ациклические мономеры на основе замещения сахара, например мономеры, конъюгированные с лигандом на основе замещения сахара, также упоминаются в данном документе как мономерные соединения с мономерными субъединицами с замещением рибозы (RRMS). Предпочтительные ациклические носители могут иметь формулу LCM-3 или LCM-4:

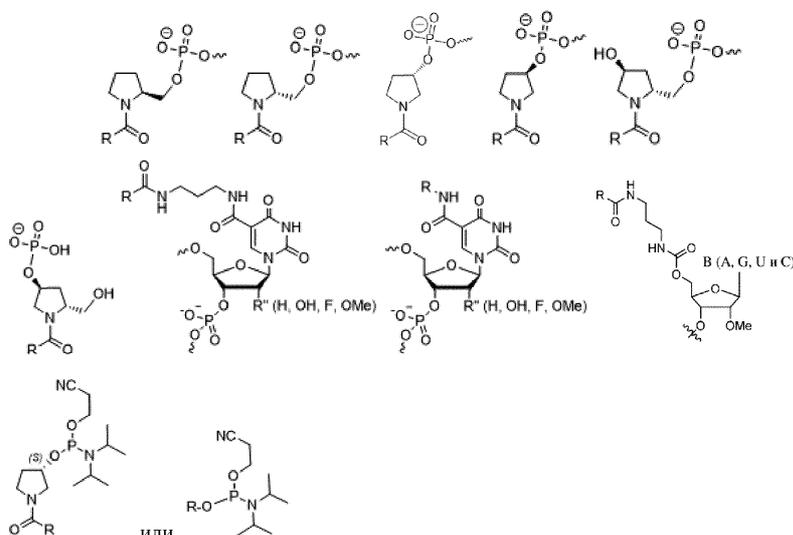


В некоторых вариантах осуществления каждый из x, y и z может равняться независимо друг от друга 0, 1, 2 или 3. В формуле LCM-3, когда y и z различны, тогда третичный атом углерода может иметь либо R-, либо S-конфигурацию. В предпочтительных вариантах осуществления x равен нулю, каждый из a y и z равен 1 в формуле LCM-3 (например, на основе серинола), и каждый из y и z равен 1 в формуле LCM-4. Каждая из приведенных ниже формул LCM-3 или LCM-4 необязательно может быть замещена, например гидрокси, алкокси, пергалогеналкилом.

Подробности о более типичных ациклических носителях на основе замещения сахара можно найти в патентах США №№ 7745608 и 8017762, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с 5'-концом смысловой цепи или 5'-концом антисмысловой цепи.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с 5'-концом цепи посредством носителя и/или линкера. В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с 5'-концом цепи посредством носителя формулы:

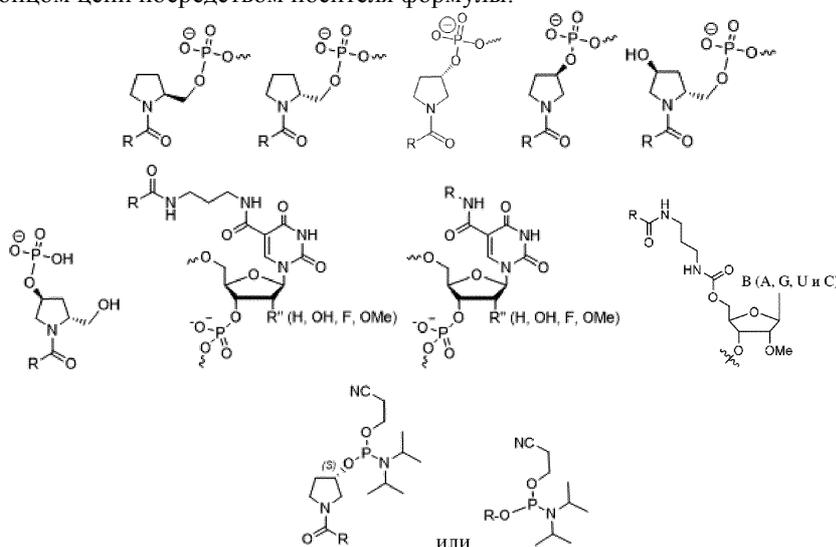


R представляет собой лиганд, например липофильный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит один

или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с 3'-концом смысловой цепи или 3'-концом антисмысловой цепи.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с 3'-концом цепи посредством носителя и/или линкера. В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с 3'-концом цепи посредством носителя формулы:



R представляет собой лиганд, например липофильный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с обоими концами смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с обоими концами антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с 5'-концом или 3'-концом смысловой цепи, и один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с 5'-концом или 3'-концом антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с терминальным концом цепи посредством одного или нескольких линкеров (связывающих фрагментов) и/или носителя.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с терминальным концом цепи посредством одного или нескольких линкеров (связывающих фрагментов).

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи посредством циклического носителя, необязательно посредством одного или нескольких промежуточных линкеров (связывающих фрагментов).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи. Внутренние положения цепи относятся к нуклеотиду в любом положении цепи, за исключением концевых положений от 3'-конца и 5'-конца цепи (например, исключая 2 положения: положение 1, считая от 3'-конца и положение 1, считая от 5'-конца).

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца цепи (например, исключая 4 положения: положения 1 и 2, считая от 3'-конца, и положения 1 и 2, считая от 5'-конца). В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца цепи (например, исключая 6 положений: положения 1, 2 и 3, считая от 3'-конца, и положения 1, 2 и 3, считая от 5'-конца).

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, за исключением участка сайта расщепления смысловой цепи, например липофильный фрагмент не конъюгирован с положениями 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи, например липофильный фрагмент не конъюгирован с положениями 9-11, считая от 5'-конца смысловой цепи. В качестве альтернативы, внутренние положения исключают положения 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые исключают участок сайта расщепления антисмысловой цепи. Например, внутренние положения исключают положения 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи, которые исключают положения 11-13 смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положения 12-14 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

В одном варианте осуществления один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 4-8 и 13-18 смысловой цепи и положения 6-10 и 15-18 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

В одном варианте осуществления один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положения 5, 6, 7, 15 и 17 смысловой цепи и положения 15 и 17 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью средства на основе двухцепочечной iRNA.

Определения

Если не даны конкретные определения, то номенклатура, используемая в связи с аналитической химией, синтетической органической химией, а также медицинской и фармацевтической химией, описанными в данном документе, и их процедуры и методики хорошо известны и широко используются в уровне техники. Для химического синтеза и химического анализа можно применять стандартные методики. Определенные такие методики и процедуры можно найти, например, в "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" под редакцией Sangvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990; а также "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications" под редакцией Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Fla. и Sambrook et al., "Molecular Cloning, A laboratory Manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, которые включены в данный документ для любых целей. Там, где это возможно, все патенты, заявки, опубликованные заявки, а также другие публикации и другие данные, упоминаемые в настоящем описании, включены посредством ссылки в полном объеме.

Если не указано иное, то следующие термины имеют приведенные ниже значения.

Используемый в данном документе термин "целевая нуклеиновая кислота" относится к любой молекуле нуклеиновой кислоты, экспрессию или активность которой можно модулировать посредством соединения на основе siRNA. Целевые нуклеиновые кислоты включают без ограничения РНК (в том числе без ограничения пре-mRNA и mRNA или их части), транскрибируемую с ДНК, кодирующей целевой белок, а также cDNA, полученную из такой РНК, и miRNA. Например, целевая нуклеиновая кислота может представлять собой клеточный ген (или mRNA, транскрибируемую из гена), экспрессия которого связана с конкретным нарушением или болезненным состоянием. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты инфекционного агента.

Используемый в данном документе термин "iRNA" относится к средству, которое опосредует целевое расщепление транскрипта РНК. Эти средства связываются с цитоплазматическим мультибелковым комплексом, известным как RNAi-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Средства, которые эффективны для индукции РНК-интерференции, также называются в данном документе siRNA, средством для RNAi или средством на основе iRNA. Таким образом, эти термины могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин iRNA включает микроРНК и пре-микроРНК. Более того, термины "соединение" или "соединения" по настоящему изобретению, используемые в данном документе, также относятся к средству на основе iRNA и могут использоваться взаимозаменяемо с термином "средство на основе iRNA".

Средство на основе iRNA должно включать область существенной гомологии с целевым геном и иметь достаточную длину с точки зрения нуклеотидов, для того, чтобы средство на основе iRNA или его фрагмент могли опосредовать отрицательную регуляцию целевого гена. (Для простоты описания термин нуклеотид или рибонуклеотид иногда используется в данном документе по отношению к одной или нескольким мономерным субъединицам средства на основе iRNA. Будет понятно, что использование термина "рибонуклеотид" или "нуклеотид" в данном документе может, в случае модифицированной РНК или заменителя нуклеотида, также относиться к модифицированному нуклеотиду или замещающему фрагменту заменителя в одном или нескольких положениях.) Таким образом, средство на основе iRNA представляет собой или включает область, которая по меньшей мере частично, а в некоторых вариантах осуществления полностью, комплементарна целевой РНК. Необязательно, чтобы между средством на основе iRNA и мишенью была полная комплементарность, но соответствие должно быть существенным для обеспечения средству на основе iRNA или продукту его расщепления возможности управлять специфическим для последовательности сайленсингом, например посредством RNAi-расщепления целевой РНК, например mRNA. Комплементарность или степень гомологии с целевой цепью наиболее важна для антисмысловой цепи. Хотя часто желательна полная комплементарность, особенно в антисмысловой цепи, некоторые варианты осуществления могут включать, в частности в антисмысловой цепи, одно или несколько или, например, 6, 5, 4, 3, 2 или меньшее количество ошибочных спариваний (в отношении целевой РНК). Смысловая цепь должна быть только существенно комплементарной с антисмысловой це-

пью для поддержания общего двухцепочечного характера молекулы.

Средства на основе iRNA включают: молекулы, которые являются достаточно длинными, чтобы запустить ответ интерферонов (которые могут быть расщеплены под действием Dicer (Bernstein et al. 2001. Nature, 409:363-366) и войти в состав RISC (RNAi-индуцированный комплекс сайленсинга)); и молекулы, которые являются достаточно короткими, чтобы не запускать ответ интерферонов (эти молекулы также могут быть расщеплены под действием Dicer и/или входить в состав RISC), например молекулы, размер которых позволяет входить в RISC, например молекулы которые сходны с продуктами расщепления Dicer. Молекулы, которые достаточно короткие для того, чтобы они не запускать ответ интерферонов, называются в данном документе средствами на основе siRNA или более короткими средствами на основе iRNA. "Средство на основе siRNA или более короткое средство на основе iRNA", используемое в данном документе, относится к средству на основе iRNA, например, средству на основе двухцепочечной РНК или средству на основе одной цепи, которое является достаточно коротким, чтобы не вызывать вредного ответа интерферонов в клетке человека, например оно имеет дуплексный участок из менее чем 60, 50, 40 или 30 пар нуклеотидов. Средство на основе siRNA или его продукт расщепления может способствовать отрицательной регуляции целевого гена, например путем индукции RNAi по отношению к целевой РНК, где мишень может включать эндогенную или патогенную целевую РНК.

"Средство на основе одноцепочечной iRNA", используемое в данном документе, представляет собой средство на основе iRNA, которое состоит из одной молекулы. Оно может включать дуплексный участок, образованный спариванием внутри цепей, например оно может представлять собой или предусматривать структуру шпильки или ручки-сковороды. Средства на основе одноцепочечной iRNA могут быть бессмысленными по отношению к целевой молекуле. Средство на основе одноцепочечной iRNA может быть достаточно длинным, чтобы оно могло входить в состав RISC и участвовать в RISC-опосредованном расщеплении целевой mRNA. Средство на основе одноцепочечной iRNA имеет длину по меньшей мере 14, а в других вариантах осуществления по меньшей мере 15, 20, 25, 29, 35, 40 или 50 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления оно составляет менее 200, 100 или 60 нуклеотидов.

Петля относится к участку цепи iRNA, который не спарен с противоположным нуклеотидом в дуплексе, когда часть цепи iRNA образует пары оснований с другой цепью или с другой частью той же цепи.

Средства на основе iRNA со шпилькой будут иметь дуплексный участок, равный или составляющий по меньшей мере 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Дуплексный участок может быть равен или составлять менее 200, 100 или 50 в длину. В определенных вариантах осуществления диапазоны для дуплексного участка составляют 15-30, 17-23, 19-23 и 19-21 пар нуклеотидов в длину. Шпилька может иметь одноцепочечный выступ или концевой непарный участок, в некоторых вариантах осуществления на 3', а в определенных вариантах осуществления на антисмысловую сторону шпильки. В некоторых вариантах осуществления выступы составляют 2-3 нуклеотида в длину.

Термин "средство на основе двухцепочечной (ds) iRNA", используемый в данном документе, представляет собой средство на основе iRNA, которое включает более одной, а в некоторых случаях две, цепи, в которых межцепочечная гибридизация может обеспечивать образование участка дуплексной структуры.

Используемые в данном документе термины "активность siRNA" и "активность RNAi" относятся к сайленсингу гена с помощью siRNA.

Используемый в данном документе "сайленсинг гена" посредством молекулы для РНК-интерференции относится к снижению уровня mRNA в клетке для целевого гена на по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 99% и до 100% включительно и любое целое число между уровнями mRNA, обнаруженными в клетке, без молекулы miRNA или для РНК-интерференции. В одном предпочтительном варианте осуществления уровни mRNA снижены на по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 99% и до 100% включительно и любое целое число в диапазоне от 5% до 100%.

Используемый в данном документе термин "модулировать экспрессию гена" означает, что экспрессия гена или уровень молекулы РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько белков или белковых субъединиц, положительно регулируется или отрицательно регулируется, таким образом, что экспрессия, уровень или активность становятся больше или меньше, чем наблюдаемые в отсутствие модулятора.

Например, термин "модулировать" может означать "подавлять", но применение слова "модулировать" не ограничивается этим определением.

Как используется в данном документе модуляция экспрессии гена происходит, когда экспрессия гена или уровень молекулы РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько бел-

ков или белковых субъединиц, на по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или более отличается от уровня, наблюдаемого в отсутствие siRNA, например средства для RNAi. Разница в% и/или кратность может быть рассчитана относительно контроля или отличного от контроля образца, например

$$\% \text{ разницы} = \frac{\text{[экспрессия в присутствии siRNA} - \text{экспрессия без siRNA]}}{\text{экспрессия без siRNA}}$$

или

$$\% \text{ разницы} = \frac{\text{[экспрессия в присутствии siRNA} - \text{экспрессия без siRNA]}}{\text{экспрессия без siRNA}}$$

Как используется в данном документе термин "подавлять", "отрицательно регулировать" или "снижать" в отношении экспрессии гена означает, что экспрессия гена или уровень молекул РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько белков или белков субъединиц, или активность одного или нескольких белков или белковых субъединиц снижается ниже уровня, наблюдаемого в отсутствие модулятора. Экспрессия гена отрицательно регулируется, когда экспрессия гена или уровень молекул РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько белков или белковых субъединиц, или активность одного или нескольких белков или белковых субъединиц снижается на по меньшей мере 10% меньше относительно соответствующего немодулированного контроля и предпочтительно на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% или наиболее предпочтительно на 100% (т.е. отсутствие экспрессии гена).

Как используется в данном документе термин "повышать", "положительно регулировать" в отношении экспрессии гена означает, что экспрессия гена или уровень молекул РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько белков или белков субъединиц, или активность одного или нескольких белков или белковых субъединиц повышается выше уровня, наблюдаемого в отсутствие модулятора. Экспрессия гена положительно регулируется, когда экспрессия гена или уровень молекул РНК или эквивалентных молекул РНК, кодирующих один или несколько белков или белковых субъединиц, или активность одного или нескольких белков или белковых субъединиц повышается на по меньшей мере 10% выше относительно соответствующего немодулированного контроля и предпочтительно на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 100%, в 1,1 раза, в 1,25 раза, в 1,5 раза, в 1,75 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 50 раз, в 100 раз или более.

Термин "повышенный" или "повышать", как используется в данном документе, как правило, означает увеличение на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений "повышенный" означает повышение на по меньшей мере 10% по сравнению с эталонным уровнем, например повышение на по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по меньшей мере приблизительно 40%, или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или до 100% повышения включительно или любое повышение в диапазоне 10-100% по сравнению с эталонным уровнем, или повышение в по меньшей мере приблизительно 2 раза, или по меньшей мере приблизительно 3 раза, или по меньшей мере приблизительно 4 раза, или по меньшей мере приблизительно 5 раз, или по меньшей мере приблизительно 10 раз или любое повышение в диапазоне от 2 раз до 10 раз или более раз по сравнению с эталонным уровнем.

Термин "сниженный" или "снижать", как используется в данном документе, как правило, означает уменьшение на статически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, "сниженный" означает уменьшение на по меньшей мере 10% по сравнению с эталонным уровнем, например уменьшение на по меньшей мере приблизительно 20%, или по меньшей мере приблизительно 30%, или по меньшей мере приблизительно 40% или по меньшей мере приблизительно 50%, или по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или до 100% уменьшения включительно (т.е. уровень отсутствия по сравнению с эталонным образцом) или любое уменьшение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем.

Двухцепочечные iRNA содержат две олигонуклеотидные цепи, которые существенно комплементарны для гибридизации с образованием дуплексной структуры. Как правило, дуплексная структура составляет 15-30, чаще 18-25, еще чаще 19-24 и чаще всего 19-21 пару оснований в длину. В некоторых вариантах осуществления предпочтительны более длинные двухцепочечные iRNA длиной от 25 до 30 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления предпочтительны более короткие двухцепочечные iRNA длиной от 10 до 15 пар оснований. В другом варианте осуществления двухцепочечная iRNA составляет в длину по меньшей мере 21 нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь РНК имеет участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части целевой последовательности, а дуплексный участок составляет 14-30 нуклеотидов в длину. Аналогично, участок комплементарности с целевой последовательностью состав-

ляет 14-30, чаще 18-25, еще чаще 19-24 и чаще всего 19-21 нуклеотид в длину.

Фраза "антисмысловая цепь", как используется в данном документе, относится к олигомерному соединению, которое в значительной степени или на 100% комплементарно целевой последовательности, представляющей интерес. Фраза "антисмысловая цепь" означает антисмысловой участок обоих олигомерных соединений, образованных из двух отдельных цепей, а также мономолекулярных олигомерных соединений, которые способны образовывать структуры типа шпильки или гантели. Термины "антисмысловая цепь" и "направляющая цепь" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Фраза "смысловая цепь" относится к олигомерному соединению, которое имеет ту же нуклеозидную последовательность, полностью или частично, что и целевая последовательность, например информационная РНК или последовательность ДНК. Термины "смысловая цепь" и "сопровождающая цепь" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Под "специфически гибридизуемым" и "комплементарным" подразумевается, что нуклеиновая кислота может образовывать водородную(ые) связь(и) с другой последовательностью нуклеиновой кислоты либо по типу традиционных взаимодействий Уотсона-Крика, либо посредством других нетрадиционных типов взаимодействий. Что касается нуклеиновых молекул по настоящему изобретению, свободная энергия связывания молекулы нуклеиновой кислоты с ее комплементарной последовательностью является достаточной для того, чтобы обеспечить выполнение соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например активности RNAi. Определение значений свободной энергии связывания для молекул нуклеиновой кислоты хорошо известно в уровне техники (см., например, Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII pp.123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner et al., 1987, Am. Chem. Soc. 109:3783-3785). Процент комплементарности указывает процент смежных остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, спаривание оснований по Уотсона-Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10, составляющие 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% комплементарности). "Полностью комплементарный" или 100% комплементарность означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут связываться посредством водородных связей с одинаковым числом смежных остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. Менее чем полностью комплементарный относится к ситуации, в которой некоторые, но не все, нуклеозидные звенья двух цепей могут образовывать водородные связи друг с другом. "Существенно комплементарный" относится к полинуклеотидным цепям, проявляющим 90% или большую комплементарность, за исключением областей полинуклеотидных цепей, таких как выступы, которые выбраны так, чтобы быть некомплементарными. Для специфического связывания требуется достаточная степень комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигомерного соединения с нецелевыми последовательностями в условиях, при которых надеются получить специфическое связывание, т.е. при физиологических условиях в случае *in vivo* анализов или терапевтического лечения или же в случае *in vitro* анализов, в условиях, при которых проводят анализы. Как правило, нецелевые последовательности отличаются по меньшей мере 5 нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный участок средства на основе двухцепочечной iRNA равен или составляет по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более пар нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь средства на основе двухцепочечной iRNA равна или составляет по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь средства на основе двухцепочечной iRNA равна или составляет по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 15 до 30 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 19 до 25 нуклеотидов каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства на основе двухцепочечной iRNA имеют длину от 21 до 23 нуклеотидов каждая.

В некоторых вариантах осуществления одна цепь содержит по меньшей мере один отрезок из 1-5 одноцепочечных нуклеотидов в двухцепочечном участке. Под "отрезком из одноцепочечных нуклеотидов в двухцепочечном участке" подразумевается, что на обоих концах одноцепочечного отрезка присутствует по меньшей мере одна пара нуклеотидных оснований. В некоторых вариантах осуществления обе цепи содержат по меньшей мере один отрезок из 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) одноцепочечных нуклеотидов в двухцепочечном участке. Когда обе цепи имеют отрезок из 1-5 (например, 1, 2, 3, 4 или 5) одноцепочечных нуклеотидов в двухцепочечном участке, такие одноцепочечные нуклеотиды могут быть противоположными друг другу (например, отрезок ошибочных спариваний), или они могут быть расположены так, что вторая цепь не имеет одноцепочечных нуклеотидов, противоположных одноцепочечным iRNA первой цепи, и *vice versa* (например, одноцепочечная петля). В некоторых вариантах осуществле-

ния одноцепочечные нуклеотиды присутствуют в пределах 8 нуклеотидов с любого конца, например 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов с 5'- или 3'-конца участка комплементарности между двумя цепями.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA содержит одноцепочечный выступ на по меньшей мере одном из концов. В одном варианте осуществления одноцепочечный выступ имеет длину 1, 2 или 3 нуклеотида.

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства на основе iRNA составляет в длину 21 нуклеотид, а длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида, при этом цепи образуют двухцепочечный участок из 21 последовательной пары оснований, имеющий одноцепочечные выступы длиной 2 нуклеотида на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь двухцепочечной iRNA имеет структуру ZXY, например как описано в публикации согласно РСТ № 2004080406, которая таким образом включена посредством ссылки в полном объеме.

В определенном варианте осуществления две цепи двухцепочечного олигомерного соединения могут быть связаны вместе. Две цепи могут быть связаны друг с другом на обоих концах или только на одном конце. Связывание на одном конце означает, что 5'-конец первой цепи связан с 3'-концом второй цепи или 3'-конец первой цепи связан с 5'-концом второй цепи. Когда две цепи связаны друг с другом на обоих концах, тогда 5'-конец первой цепи связывается с 3'-концом второй цепи, а 3'-конец первой цепи связывается с 5'-концом второй цепи. Две цепи могут быть связаны вместе олигонуклеотидным линкером, в том числе без ограничения $(N)_n$; где N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а n составляет 3-23. В некоторых вариантах осуществления n составляет 3-10, например 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный линкер выбран из группы, состоящей из GNRA, $(G)_4$, $(U)_4$, а также $(dT)_4$, где N представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а R представляет собой модифицированный или немодифицированный пуриновый нуклеотид. Некоторые нуклеотиды в линкере могут участвовать во взаимодействиях пар оснований с другими нуклеотидами линкера. Две цепи также могут быть связаны вместе при помощи линкера, отличного от нуклеозидного, например линкера, описанного в данном документе. Специалисту в данной области будет понятно, что в олигонуклеотидном линкере могут быть использованы любые химические модификации или вариации олигонуклеотидов, описанные в данном документе.

Олигомерные соединения типа шпильки и гантели будут иметь дуплексный участок, равный или составляющий по меньшей мере 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Дуплексный участок может быть равен или составлять менее 200, 100 или 50 в длину. В некоторых вариантах осуществления диапазоны для дуплексного участка составляют 15-30, 17-23, 19-23 и 19-21 пара нуклеотидов в длину.

Олигомерные соединения типа шпильки могут иметь одноцепочечный выступ или концевой непарный участок, в некоторых вариантах осуществления на 3', а в некоторых вариантах осуществления на антисмысловой стороне шпильки. В некоторых вариантах осуществления выступы составляют 1-4, более часто 2-3 нуклеотида в длину. Олигомерные соединения типа шпильки, которые могут вызывать РНК-интерференцию, также называются в данном документе "shRNA".

В определенных вариантах осуществления две олигомерные цепи специфически гибридизуются, когда имеется достаточная степень комплементарности для избежания неспецифического связывания антисмыслового соединения с нецелевыми последовательностями нуклеиновых кислот, в условиях, в которых желательно специфическое связывание, т.е. в физиологических условиях в случае анализов *in vivo* или терапевтического лечения и в условиях, при которых анализы проводят *in vitro*.

Как используется в данном документе "жесткие условия гибридизации" или "жесткие условия" относятся к условиям, при которых антисмысловое соединение будет гибридизоваться со своей целевой последовательностью и с минимальным количеством других последовательностей. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в разных обстоятельствах, а "жесткие условия", при которых антисмысловые соединения гибридизуются с целевой последовательностью, определяются природой и составом антисмысловых соединений и анализами, в которых они исследуются.

В уровне техники понятно, что включение модификаций нуклеотидной аффинности может обеспечивать большее количество ошибочных спариваний по сравнению с немодифицированным соединением. Точно так же определенные олигонуклеотидные последовательности могут быть более толерантными к ошибочным спариваниям, чем другие олигонуклеотидные последовательности. Специалист в данной области способен определить соответствующее количество ошибочных спариваний между олигонуклеотидами или между олигонуклеотидом и целевой нуклеиновой кислотой, как, например, путем определения температуры плавления (T_m). T_m или ΔT_m могут быть вычислены посредством методик, которые известны среднему специалисту в данной области. Например, методики, описанные в Freier et al. (Nucleic Acids Research, 1997, 25, 22: 4429-4443) обеспечивают среднему специалисту в данной области возможность оценить нуклеотидные модификации на предмет их способности повышать температуру плавления дуплекса РНК:ДНК.

Разработка siRNA.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 19 нт, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 20 нт, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, имеющий длину 21 нт, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (нт) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (нт), где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец iRNA тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нт. Предпочтительно, выступ из 2 нт находится на 3'-конце антисмысловой цепи. Необязательно, средство на основе iRNA дополнительно содержит лиганд (например, GalNAc₃).

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где длина смысловой цепи составляет 25-30 нуклеотидных остатков, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положения 1), в положениях 1-23 первой цепи содержатся по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой цепи составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи является неспаренным со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой цепью, вследствие чего образуется одноцепочечный 3'-выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, вследствие чего образуется одноцепочечный 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выравниваются для обеспечения максимальной комплементарности, вследствие чего образуется практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи в длину, чтобы снижать экспрессию целевого гена при введении указанной двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где указанное средство на основе iRNA содержит первую цепь с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь с длиной, которая составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца; где указанный 3'-конец указанной первой цепи и указанный 5'-конец указанной второй цепи образуют тупой конец, а указанная вторая цепь на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая цепь, где дуплексный участок имеет длину по меньшей мере 25 нуклеотидов, а указанная вторая цепь в достаточной степени комплементарна целевой mRNA на протяжении по меньшей мере 19 нт длины указанной второй цепи для снижения экспрессии целевого гена, где указанное средство на основе iRNA вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление указанной iRNA при помощи Dicer предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую указанный 3'-конец указанной второй цепи, снижая, таким образом, экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно, средство на основе iRNA дополнительно содержит лиганд (например, GalNAc₃).

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства на основе iRNA содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи. Например, смысловая цепь может содержать по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в пределах

положений 7-15 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь средства на основе iRNA может также содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи или рядом с ним. Например, антисмысловая цепь может содержать по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-модификаций трех последовательных нуклеотидов в пределах положений 9-15 от 5'-конца.

Для средства на основе iRNA с дуплексным участком, имеющим длину 17-23 нт, сайт расщепления антисмысловой цепи находится, обычно, около 10, 11 и 12 положений от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1^{го} нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи, или отсчет начинается с 1^{го} спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка iRNA от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления в пределах цепи или рядом с ним и по меньшей мере один из мотивов находится в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь также содержит по меньшей мере один мотив из трех

идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления в пределах цепи или рядом с ним. Модификация в мотиве, встречающемся в сайте расщепления в смысловой цепи или рядом с ним, отличается от модификации в мотиве, встречающемся в сайте расщепления в антисмысловой цепи или рядом с ним.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов, где по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления в цепи или рядом с ним. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь также содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метилмодификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

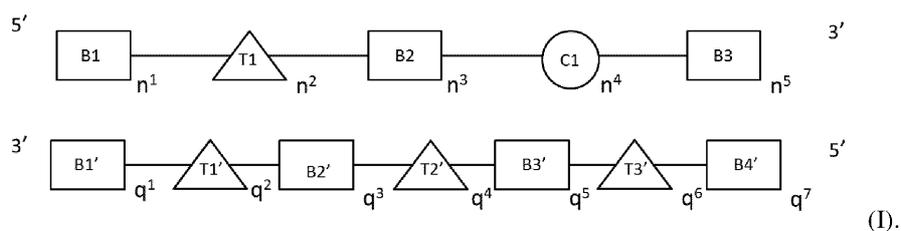
В некоторых вариантах осуществления средство на основе iRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца, и где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метилмодификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению содержит ошибочное(ые) спаривание(я) с мишенью, в пределах дуплексах или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или в дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, исходя из свободной энергии ассоциации или диссоциации для конкретного спаривания, при этом наиболее простым подходом является исследование пар по отдельности для каждой пары, хотя также можно применять анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например неканонические или отличные от канонических спаривания (описанные в других местах данного документа), предпочтительнее канонических спариваний (A:T, A:U, G:C); и спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических спариваний.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных участков от 5'-конца антисмысловой цепи, которые независимо могут быть выбраны из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например с неканоническими или отличными от канонического спариваниями или спариваниями, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

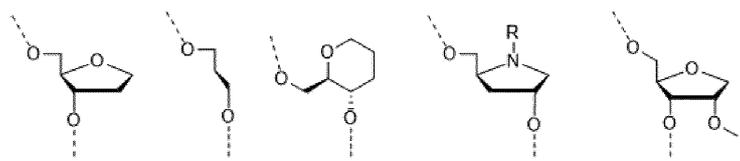
В одном варианте осуществления нуклеотид в 1 положении в дуплексном участке от 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи является парой оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи является парой оснований AU.

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

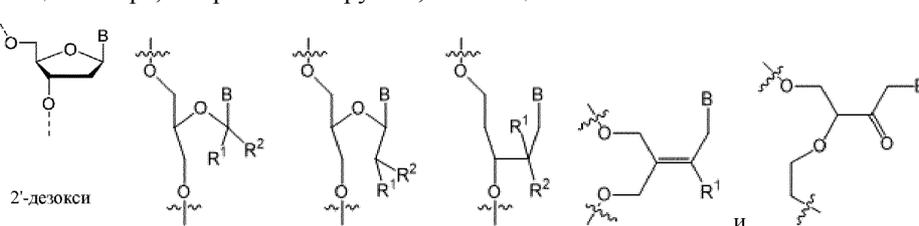


В формуле (I) каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, имеющий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМе-модификации. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМе- или 2'-F-модификации. В одном варианте осуществления по меньшей мере один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-О-N-метилацетидами (2'-О-NMA)-модификацию.

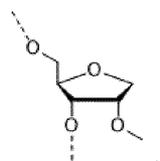
C1 представляет собой нарушающий термостабильность нуклеотид, помещенный в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой цепи (т.е. находящемуся в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой цепи). Например, C1 находится в положении смысловой цепи, которое образует пару с нуклеотидом в положениях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



и iii) модификации сахара, выбранной из группы, состоящей из:



где B представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R¹ и R² независимо представляют собой H, галоген, (Жз или алкил; и R3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. В одном варианте осуществления нарушающая термостабильность модификация в C1 представляет собой ошибочное спаривание, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:T, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и необязательно по меньшей мере одно нуклеиновое основание в ошибочно спаренной паре представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание. В одном примере нарушающая термостабильность модификация в C1 представляет собой GNA или



Каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может находиться в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида, или модификация может находиться в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида в положении, которое является аналогичным или подобным 2'-положению рибозного сахара, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему.

Например, каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

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

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

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

Длина q^5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

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

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

В одном варианте осуществления n^4 может равняться 0. В одном примере n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1. В другом примере n^4 равняется 0, а q^2 и q^6 равняются 1, при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления каждый из n^4 , q^2 и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления каждый из n^2 , n^4 , q^2 , q^4 и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления C1 находится в положениях 14-17 от 5'-конца смысловой цепи, если длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и n^4 равняется 1. В одном варианте осуществления C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи.

В одном варианте осуществления T3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1.

В одном варианте осуществления T1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1.

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

В одном варианте осуществления T1' и T3' разделены участком длиной 11 нуклеотидов (т.е. без учета нуклеотидов T1' и T3').

В одном варианте осуществления T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1, и модификация находится в 2'-положении или положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией.

В одном варианте осуществления T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1, и модификация в 2'-положении или положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией, или объем, равный таковому.

В одном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, в случае если длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1. В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, в случае если длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1.

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равняется 1.

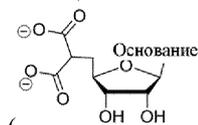
В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи, к примеру в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, в случае если длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и n^2 равняется 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равняется 1, и модификация в T1' находится в 2'-положении рибозного сахара или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией; T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равняется 1; и T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равняется 1, и модификация в T3' находится в 2'-положении или в положениях в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остове нуклеотида, что придает ему меньший стерический объем, чем у рибозы с 2'-ОМе-модификацией, или объем, равный таковому.

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равняется 2.

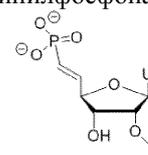
В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' находится в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равняется 1.

ется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи).

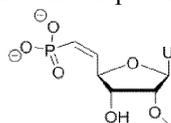
Средство на основе dsRNA может иметь фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. 5'-Концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфотиоат (5'-SP), 5'-концевой фосфодитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винил-



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



5'-VP может представлять собой либо изомер 5'-E-VP (т.е. транс-винилфосфат,



либо изомер 5'-Z-VP (т.е. цис-винилфосфат,

либо их смеси. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA имеет фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA имеет фосфорсодержащую группу на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-P. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-P в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-PS. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-PS в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-VP. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-VP в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-E-VP в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-Z-VP в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-PS₂ в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил в антисмысловой цепи.

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

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1. Средство на основе dsRNA также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

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

пи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство на основе dsRNA также содержит 5'-PS₂.

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

В одном варианте осуществления модифицировано 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% средства на основе dsRNA по настоящему изобретению. Например, если модифицировано 50% средства на основе dsRNA, то 50% всех нуклеотидов, присутствующих в средстве на основе dsRNA, имеют модификацию, описанную в данном документе.

В одном варианте осуществления каждая из смысловых и антисмысловых цепей средства на основе dsRNA независимо модифицирована с помощью ациклических нуклеотидов, LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксидезокси, 2'-фтора, 2'-О-N-метилацетамида (2'-О-NMA), 2'-О-диметиламиноэтоксиэтила (2'-О-DMAEOE), 2'-О-аминопропила (2'-О-AP) или 2'-ара-Ф.

В одном варианте осуществления каждая из смысловых и антисмысловых цепей средства на основе dsRNA имеет по меньшей мере две разные модификации.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA формулы (I) дополнительно содержит 3'- и/или 5'-выступ(ы) из 1-10 нуклеотидов в длину. В одном примере средство на основе dsRNA формулы (I) содержит 3'-выступ на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. В другом примере средство на основе dsRNA имеет 5'-выступ на 5'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA по настоящему изобретению не имеет какой-либо 2'-F-модификации.

В одном варианте осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь средства на основе dsRNA содержит один или несколько блоков фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. В одном примере смысловая цепь содержит один блок из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. В одном примере антисмысловая цепь содержит два блока из двух фосфотиоатных или

метилфосфонатных межнуклеотидных связей. Например, два блока из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей разделены 16-18 фосфонатными межнуклеотидными связями.

В одном варианте осуществления каждая из смысловых и антисмысловых цепей средства на основе dsRNA содержит 15-30 нуклеотидов. В одном примере смысловая цепь содержит 19-22 нуклеотида, а антисмысловая цепь содержит 19-25 нуклеотидов. В другом примере смысловая цепь содержит 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь содержит 23 нуклеотида.

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

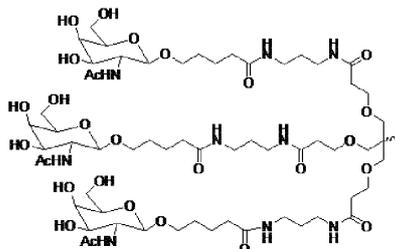
В одном варианте осуществления антисмысловая цепь средства на основе dsRNA по настоящему изобретению на 100% комплементарна целевой РНК, с которой она гибридизируется и экспрессию которой подавляет посредством РНК-интерференции. В другом варианте осуществления антисмысловая цепь средства на основе dsRNA по настоящему изобретению на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% или по меньшей мере 50% комплементарна целевой РНК.

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

Нарушающий термостабильность нуклеотид может встречаться, например, между положениями 14-

17 от 5'-конца смысловой цепи, если длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе-модификации. Предпочтительно две модифицированные нуклеиновые кислоты, которые меньше стерически требовательной 2'-ОМе, разделены участком длиной 11 нуклеотидов. Например, две модифицированные нуклеиновые кислоты находятся в положениях 2 и 14 от 5'-конца антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство на основе dsRNA дополнительно содержит по меньшей мере один лиганд ASGPR. Например, лиганд ASGPR представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера, как, например:



В одном примере лиганд ASGPR присоединен к 3'-концу смысловой цепи.

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство на основе dsRNA также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство на основе dsRNA также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равняется 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство на основе dsRNA также

цепи.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равняется 8, Т1 представляет собой 2'F, n^2 равняется 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равняется 7, n^4 равняется 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равняется 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равняется 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равняется 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равняется 4, q^4 равняется 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равняется 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равняется 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равняется 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство на основе dsRNA также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

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

В конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) необязательно лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера; и
 - (iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и
 - (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину, составляющую 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23, а также 2'F-модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, а также между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);
- где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

- (a) смысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 - (ii) необязательно лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;
 - (iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21, а также 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и
 - (iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и
 - (b) антисмысловую цепь, имеющую:
 - (i) длину, составляющую 23 нуклеотида;
 - (ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, а также 2'F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (считая от 5'-конца); и
 - (iii) 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 (считая от 5'-конца);
- где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;
 (ii) необязательно лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 25 нуклеотидов;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

(ii) необязательно лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR со-

держит три производных GalNAc, присоединенных посредством трехвалентного разветвленного линкера;

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 23 нуклеотида;

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

(iii) 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 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 19 нуклеотидов;

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

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

(iv) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (считая от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 21 нуклеотид;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 19 и 20 и между нуклеотидными положениями 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 18-23 нуклеотида;

(ii) три последовательных 2'-F-модификации в положениях 7-15; и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 18-23 нуклеотида;

(ii) по меньшей мере 2'-F-модификации в любом месте цепи; и

(iii) по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и либо два нуклеотида, выступающие на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи; либо тупой конец обоих концов дуплекса.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 18-23 нуклеотида;

(ii) менее четырех 2'-F-модификаций;

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 18-23 нуклеотида;

(ii) при менее двенадцати 2'-F-модификациях; и

(iii) по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и либо два нуклеотида, выступающие на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи; либо тупой конец обоих концов дуплекса.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 19-35 нуклеотидов;

(ii) менее четырех 2'-F-модификаций;

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину, составляющую 19-35 нуклеотидов;

(ii) при менее двенадцати 2'-F-модификациях; и

(iii) по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах (считая от 5'-конца);

где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); и где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и либо два нуклеотида, выступающие на 3'-конце антисмысловой цепи, и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи; либо тупой конец обоих концов дуплекса.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат смысловую цепь и антисмысловые цепи, имеющие длину 15-30 нуклеотидов; по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах антисмысловой цепи (считая от 5'-конца); где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и где средства на основе dsRNA содержат менее 20%, менее 15% и менее 10% неприродных нуклеотидов.

Примеры неприродных нуклеотидов включают ациклические нуклеотиды, LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-дезоксид, 2'-фтор, 2'-О-Н-метилацетидамидо (2'-О-NMA), 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE), 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) или 2'-ара-Ф и другие.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат смысловую цепь и антисмысловые цепи, имеющие длину 15-30 нуклеотидов; по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах антисмысловой цепи (считая от 5'-конца); где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и где средства на основе dsRNA содержат более 80%, более 85% и более 90% природных нуклеотидов, например 2'-ОН, 2'-дезоксид и 2'-Оме являются природными нуклеотидами.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат смысловую цепь и антисмысловые цепи, имеющие длину 15-30 нуклеотидов; по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи в первых пяти нуклеотидах антисмысловой цепи (считая от 5'-конца); где дуплексный участок составляет от 19 до 25 пар оснований (предпочтительно 19, 20, 21 или 22); где средства на основе dsRNA содержат один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; и где средства на основе dsRNA содержат 100% природных нуклеотидов, например 2'-ОН, 2'-дезоксид и 2'-Оме являются природными нуклеотидами.

Примеры липофильных фрагментов включают без ограничения липид (насыщенная или ненасыщенная C₄-C₃₀-углеводородная цепь и необязательная функциональная группа, выбранная из группы, состоящей из гидроксид, амина, карбоновой кислоты, сульфата, фосфата, тиола, азида и алкина), холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексанол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой C₆-C₃₀ кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексановую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т.д.) или C₆-C₃₀-спирт (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин Е, холестерин и т.п.).

В одном примере липофильный фрагмент представляет собой насыщенную или ненасыщенную C₆-C₁₈-углеводородную цепь.

В одном примере липофильный фрагмент представляет собой докозагексановую кислоту.

В одном варианте осуществления средства на основе dsRNA по настоящему изобретению содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая цепь содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где последовательность смысловой цепи представлена формулой (I):



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

каждый из p и q независимо составляет 0-6;

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

каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1, 2, 3, 4, 5 или 6 модифицированных нуклеотидов;

каждый из n_p и n_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию;

где каждый из XXX , YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов;

где средства на основе dsRNA имеют один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими положениями на по меньшей мере одной цепи; а также

где антисмысловая цепь dsRNA содержит два блока из одной, двух или трех фосфотиоатных 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.

В различных публикациях описаны мультимерные siRNA, и все их можно применять в случае iRNA по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые тем самым включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления модифицировано 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35% или 30% средства на основе iRNA по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой цепей средства на основе iRNA независимо модифицирована с помощью ациклических нуклеотидов, LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезокси, 2'-фтора, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA), 2'-О-диметиламиноэтоксиэтила (2'-О-DMAEOE), 2'-О-аминопропила (2'-О-AP) или 2'-ара-Ф.

В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой цепей средства на основе iRNA имеет по меньшей мере две разные модификации.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению не содержит какую-либо 2'-F-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать 2'-F-модификаций. В одном примере средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит девять или десять 2'-F-модификаций.

Средство на основе iRNA по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида в смысловой цепи или антисмысловой цепи; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть таким же, как у антисмысловой цепи, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления iRNA имеет фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который является следующим за выступающим нуклеотидом. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, и третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за выступающим нуклеотидом. Предпочтительно эти три концевые нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысло-

вой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь средства на основе iRNA содержит один или несколько блоков из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. В одном примере смысловая цепь содержит один блок из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. В одном примере антисмысловая цепь содержит два блока из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей. Например, два блока из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей разделены 16-18 фосфатными межнуклеотидными связями.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь средства на основе iRNA по настоящему изобретению на 100% комплементарна целевой РНК, с которой она гибридизируется и экспрессию которой подавляет посредством РНК-интерференции. В другом варианте осуществления антисмысловая цепь средства на основе iRNA по настоящему изобретению на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 55% или на по меньшей мере 50% комплементарна целевой РНК.

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

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению, раскрытое в данном документе, представляет собой миметик miRNA. В одной конструкции миметики miRNA представляют собой двухцепочечные молекулы (например, с дуплексным участком от приблизительно 16 до приблизительно 31 нуклеотида в длину) и содержат одну или несколько последовательностей, которые идентичны зрелой цепи данной miRNA. Миметики двухцепочечной miRNA характеризуются конструкциями, аналогичными описанным выше для двухцепочечных iRNA. В некоторых вариантах осуществления миметик miRNA содержит дуплексный участок длиной от 16 до 31 нуклеотида и один или несколько из следующих паттернов химической модификации: смысловая цепь содержит 2'-О-метильные модификации нуклеотидов 1 и 2 (считая от 5'-конца смыслового олигонуклеотида) и все из С и U; модификации антисмысловой цепи могут включать 2'F-модификацию всех из С и U, фосфорилирование 5'-конца олигонуклеотида и стабилизированные межнуклеотидные связи, связанные с 2 нуклеотидами выступа на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению, раскрытое в данном документе, представляет собой анти-miR. В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два анти-miR, ковалентно связанных друг с другом посредством линкера на основе нуклеотидов или линкера, отличного от линкера на основе нуклеотидов, например линкера, описанного в настоящем изобретении, или связанных друг с другом нековалентным типом связи. Термины "анти-miR", "ингибитор микроРНК" или "ингибитор miR" являются синонимами и относятся к олигонуклеотидам или модифицированным олигонуклеотидам, которые препятствуют активности конкретных miRNA. Ингибиторы могут принимать различные конфигурации, в том числе одноцепочечные, двухцепочечные (дуплексы РНК/РНК или РНК/ДНК) и конструкции шпильки, в общем, ингибиторы микроРНК содержат одну или несколько последовательностей или частей последовательностей, которые комплементарны или частично комплементарны зрелой цепи (или цепям) целевой miRNA, кроме того, ингибитор miRNA также может включать дополнительные последовательности, расположенные 5' и 3' относительно последовательности, обратно комплементарной зрелой miRNA. Дополнительные последовательности могут быть обратно комплементарными последовательностям последовательностей, которые соседствуют со зрелой miRNA в при-miRNA, из которой происходит зрелая miRNA, или дополнительные последовательности могут быть произвольными последовательностями (имеющими смесь А, G, C, U или dT). В некоторых вариантах осуществления одна или обе дополнительные последовательности представляют собой произвольные последовательности, способные образовывать шпильки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления последовательность, которая является обратно комплементарной miRNA, фланкирована на 5'-стороне и 3'-стороне шпильчатыми структурами. Ингибиторы микроРНК, когда они двухцепочечные, могут включать ошибочные спаривания между нуклеотидами на противоположных цепях. Кроме того, ингибиторы микроРНК могут быть связаны с конъюгиро-

ванными фрагментами, чтобы облегчить захват ингибитора клеткой.

Ингибиторы микроРНК, в том числе ингибиторы шпилечной miRNA, подробно описаны в Vermeulen et al., "Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function", *RNA* 13: 723-730 (2007), а также в WO2007/095387 и WO 2008/036825, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Специалист в данной области может выбрать последовательность из базы данных для желаемой miRNA и разработать ингибитор, применимый для описанных в данном документе способов.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению, раскрытое в данном документе, представляет собой антагомир. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два антагомира, ковалентно связанных друг с другом посредством линкера на основе нуклеотидов или линкера, отличного от линкера на основе нуклеотидов, например линкера, описанного в настоящем изобретении, или связанных друг с другом нековалентным типом связи. Антагомиры представляют собой РНК-подобные олигонуклеотиды, которые несут различные модификации для защиты РНКаз и обладают фармакологическими свойствами, такими как усиленное поглощение тканями и клетками. Они отличаются от нормальной РНК, например полным 2'-О-метилированием сахара, фосфотиоатной межсахарной связью и, например, холестеринным фрагментом на 3'-конце. В предпочтительном варианте осуществления антагомир предусматривает 2'-О-метильную модификацию на всех нуклеотидах, холестеринный фрагмент на 3'-конце, две фосфотиоатные межсахарные связи в первых двух положениях на 5'-конце и четыре фосфотиоатные связи на 3'-конце молекулы. Антагомиры можно использовать для эффективного сайленсинга эндогенных miRNA путем образования дуплексов, содержащих антагомир и эндогенную miRNA, тем самым предотвращая индуцированный miRNA сайленсинг генов. Примером опосредованного антагомиром сайленсинга miRNA является сайленсинг miR-122, описанный в Krutzfeldt et al., *Nature*, 2005, 438: 685-689, которая явным образом включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Недавние исследования показали, что dsRNA также может активировать экспрессию генов, механизм, который получил название "активация генов, индуцированная малой РНК" или RNAa (активирующая РНК); см., например, Li, L.C. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006), 103(46): 17337-42 и Li L.C. (2008). "Small RNA-Mediated Gene Activation". *RNA and the Regulation of Gene Expression: A Hidden Layer of Complexity*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-25-7. Было показано, что dsRNA, нацеленные на промоторы генов, вызывают мощную активацию транскрипции связанных генов. Эндогенная miRNA, вызывающая RNAa, также была обнаружена у людей. Check E. *Nature* (2007). 448 (7156): 855-858.

Еще одно удивительное наблюдение заключается в том, что активация генов посредством RNAa длительно сохраняется. Было замечено, что индукция экспрессии генов продолжается более десяти дней. Продолжительное действие RNAa можно объяснить эпигенетическими изменениями в целевых сайтах dsRNA. В некоторых вариантах осуществления РНК-активатор может увеличивать экспрессию гена. В некоторых вариантах осуществления повышенная экспрессия гена подавляет жизнеспособность, развитие роста и/или репродуктивность.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления раскрытое в данном документе соединение по настоящему изобретению представляет собой активирующую РНК. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две активирующие РНК, ковалентно связанных друг с другом посредством линкера на основе нуклеотидов или линкера, отличного от линкера на основе нуклеотидов, например линкера, описанного в настоящем изобретении, или связанных друг с другом нековалентным типом связи.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению, раскрытое в данном документе, представляет собой триплекс-образующий олигонуклеотид (ТФО). В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два ТФО, ковалентно связанных друг с другом посредством линкера на основе нуклеотидов или линкера, отличного от линкера на основе нуклеотидов, например линкера, описанного в настоящем изобретении, или связанных друг с другом нековалентным типом связи. Недавние исследования показали, что могут быть разработаны триплексообразующие олигонуклеотиды, которые могут распознавать и связываться с участками полипурина/полипиримидина в двухцепочечной спиральной ДНК специфическим для последовательности образом. Эти правила распознавания изложены в Maher III, L.J., et al., *Science* (1989) vol. 245, pp. 725-730; Moser, H. E., et al., *Science* (1987) vol. 238, pp. 645-630; Beal, P.A., et al., *Science* (1992) vol. 251, pp. 1360-1363; Conney, M., et al., *Science* (1988) vol. 241, pp. 456-459 и Hogan, M.E., et al., EP Publication 375408. Модификация олигонуклеотидов, такая как введение интеркаляторов и замены межсахарных связей, а также оптимизация условий связывания (рН и концентрация катионов) помогли преодолеть естественные препятствия для активности ТФО, такие как отталкивание зарядов и нестабильность, и недавно было показано, что синтетические олигонуклеотиды могут быть нацелены на определенные последовательности (недавний обзор см. Seidman and Glazer, *J Clin Invest* 2003; 112:487-94). В целом, триплексообразующий олигонуклеотид имеет соответствие последовательностей:

олиго 3'-A G G T;
 дуплекс 5'-A G C T;
 дуплекс 3'-T C G A.

Однако было показано, что триплеты A-AT и G-GC обладают наибольшей стабильностью тройной спирали (Reither and Jeltsch, BMC Biochem, 2002, Sept12, электронная публикация). Те же авторы продемонстрировали, что TFO, сконструированные в соответствии с правилом A-AT и G-GC, не образуют неспецифических триплексов, указывая тем самым, что образование триплексов действительно специфично для последовательности.

Таким образом, для любой данной последовательности можно разработать последовательность, образующую триплекс. Триплексобразующие олигонуклеотиды предпочтительно имеют длину по меньшей мере 15, более предпочтительно 25, еще более предпочтительно 30 или более нуклеотидов, до 50 или 100 нуклеотидов.

Образование структуры тройной спиральной с целевой ДНК вызывает стерические и функциональные изменения, блокируя инициацию транскрипции и элонгацию, позволяя внести желаемые изменения последовательности в эндогенную ДНК и обеспечивая специфическую отрицательную регуляцию экспрессии генов. Примеры такой супрессии экспрессии генов в клетках, обработанных TFO, включают нокаут эписомальных supFG1 и эндогенных генов HPRT в клетках млекопитающих (Vasquez et al., Nucl Acids Res. 1999; 27: 1176-81, and Puri, et al., J Biol Chem, 2001; 276:28991-98), а также специфическую для последовательности и мишени отрицательную регуляцию экспрессии фактора транскрипции Ets2, важного в этиологии рака простаты (Carbone, et al., Nucl Acid Res. 2003; 31:833-43), и провоспалительного гена ICAM-1 (Besch et al., J Biol Chem, 2002; 277:32473-79). Кроме того, Vuyisich и Beal недавно показали, что TFO, специфичные для последовательности, могут связываться с dsRNA, подавляя активность dsRNA-зависимых ферментов, таких как RNA-зависимые киназы (Vuyisich and Beal, Nuc. Acids Res 2000; 28:2369-74).

Кроме того, TFO, разработанные в соответствии с вышеупомянутыми принципами, могут индуцировать направленный мутагенез, способный влиять на репарацию ДНК, тем самым обеспечивая как отрицательную, так и положительную регуляцию экспрессии эндогенных генов (Seidman and Glazer, J Clin Invest 2003; 112:487-94). Подробное описание конструкции, синтеза и введения эффективных TFO можно найти в заявках на патент США №№ 2003017068 и 20030096980 от Froehler et al., а также 20020128218 и 20020123476 от Emanuele et al., а также патенте США № 5721138 от Lawn; содержание которых тем самым включено в данный документ при помощи ссылки в полном объеме.

Модификации нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну модификацию нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе. Например, по меньшей мере одна модификация, выбранная из группы, состоящей из модифицированной межнуклеозидной связи, модифицированного нуклеинового основания, модифицированного сахара и любых их комбинаций. Без ограничений такая модификация может присутствовать в любом месте средства на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению. Например, модификация может присутствовать в одной из молекул РНК.

Модификации нуклеиновых кислот (нуклеиновые основания).

Встречающаяся в природе основная часть нуклеозида, как правило, представляет собой гетероциклическое основание. Двумя наиболее распространенными классами таких гетероциклических оснований являются пурины и пиримидины. Для тех нуклеозидов, которые включают пентофуранозильный сахар, фосфатная группа может быть связана с 2', 3' или 5' гидроксильным фрагментом сахара. При образовании олигонуклеотидов эти фосфатные группы ковалентно связывают соседние нуклеозиды друг с другом с образованием линейного полимерного соединения. В пределах олигонуклеотидов фосфатные группы, как правило, называют образующими межнуклеозидный остов олигонуклеотида. Встречающаяся в природе связь или остов РНК и ДНК представляет собой 3'-5'-фосфодиэфирную связь.

В дополнение к "немодифицированным" или "природным" нуклеиновым основаниям, таким как пуриновые нуклеиновые основания, аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые нуклеиновые основания, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U), многие модифицированные нуклеиновые основания или миметики нуклеиновых оснований, известные специалистам в данной области, пригодны для соединений, описанных в данном документе. Немодифицированные или природные нуклеиновые основания можно модифицировать или подвергать замещению для получения iRNA с улучшенными свойствами. Например, устойчивые к нуклеазе олигонуклеотиды могут быть получены с применением таких оснований или синтетических и природных нуклеиновых оснований (например, инозин, ксантин, гипоксантин, нубуларин, изогуанизин или туберцидин) и любой из описанных в данном документе модификаций олигомеров. В качестве альтернативы, можно использовать замещенные или модифицированные аналоги любого из вышеуказанных оснований и "универсальные основания". Когда природное основание замещено неприродным и/или универсальным основанием, считается, что нуклеотид включает модифицированное нуклеиновое основание и/или модификацию нуклеинового основания из данного документа. Модифициро-

ванные нуклеиновые основания и/или модификации нуклеиновых оснований также включают природные, неприродные и универсальные основания, которые содержат конъюгированные фрагменты, например лиганд, описанный в данном документе. Предпочтительные конъюгированные фрагменты для конъюгирования с нуклеиновыми основаниями включают катионные аминогруппы, которые могут быть конъюгированы с нуклеиновыми основаниями посредством соответствующего алкила, алкенила или линкера с амидной связью.

Олигомерные соединения, описанные в данном документе, также могут предусматривать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в уровне техники просто "основанием"). Как используется в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Иллюстративные модифицированные нуклеиновые основания включают без ограничения другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин, нубуларин, изогуанизин, туберцидин, 2-(галоген)аденин, 2-(алкил)аденин, 2-(пропил)аденин, 2-(амино)аденин, 2-(аминоалкил)аденин, 2-(аминопропил)аденин, 2-(метилтио)-N⁶-(изопентенил)аденин, 6-(алкил)аденин, 6-(метил)аденин, 7-(деаза)аденин, 8-(алкенил)аденин, 8-(алкил)аденин, 8-(алкинил)аденин, 8-(амино)аденин, 8-(галоген)аденин, 8-(гидроксил)аденин, 8-(тиоалкил)аденин, 8-(тиол)аденин, N⁶-(изопентил)аденин, N⁶-(метил)аденин, N⁶,N⁶-(диметил)аденин, 2-(алкил)гуанин, 2-(пропил)гуанин, 6-(алкил)гуанин, 6-(метил)гуанин, 7-(алкил)гуанин, 7-(метил)гуанин, 7-(деаза)гуанин, 8-(алкил)гуанин, 8-(алкенил)гуанин, 8-(алкинил)гуанин, 8-(амино)гуанин, 8-(галоген)гуанин, 8-(гидроксил)гуанин, 8-(тиоалкил)гуанин, 8-(тиол)гуанин, N-(метил)гуанин, 2-(тио)цитозин, 3-(деаза)-5-(аза)цитозин, 3-(алкил)цитозин, 3-(метил)цитозин, 5-(алкил)цитозин, 5-(алкинил)цитозин, 5-(галоген)цитозин, 5-(метил)цитозин, 5-(пропинил)цитозин, 5-(пропинил)цитозин, 5-(трифторметил)цитозин, 6-(азо)цитозин, N-(ацетил)цитозин, 3-(3-амино-3-карбоксивпропил)урацил, 2-(тио)урацил, 5-(метил)-2-(тио)урацил, 5-(метиламинометил)-2-(тио)урацил, 4-(тио)урацил, 5-(метил)-4-(тио)урацил, 5-(метиламинометил)-4-(тио)урацил, 5-(метил)-2,4-(дитио)урацил, 5-(метиламинометил)-2,4-(дитио)урацил, 5-(2-аминопропил)урацил, 5-(алкил)урацил, 5-(алкинил)урацил, 5-(аллиламино)урацил, 5-(аминоаллил)урацил, 5-(аминоалкил)урацил, 5-(гуанидинийалкил)урацил, 5-(1,3-диазол-1-алкил)урацил, 5-(цианоалкил)урацил, 5-(диалкиламиноалкил)урацил, 5-(диметиламиноалкил)урацил, 5-(галоген)урацил, 5-(метокси)урацил, урацил-5-оксиуксусная кислота, 5-(метоксикарбонилметил)-2-(тио)урацил, 5-(метоксикарбонил-метил)урацил, 5-(пропинил)урацил, 5-(пропинил)урацил, 5-(трифторметил)урацил, 6-(азо)урацил, дигидроурацил, N-(метил)урацил, 5-урацил (т.е. псевдоурацил), 2-(тио)псевдоурацил, 4-(тио)псевдоурацил, 2,4-(дитио)псевдоурацил, 5-(алкил)псевдоурацил, 5-(метил)псевдоурацил, 5-(алкил)-2-(тио)псевдоурацил, 5-(метил)-2-(тио)псевдоурацил, 5-(алкил)-4-(тио)псевдоурацил, 5-(метил)-4-(тио)псевдоурацил, 5-(алкил)-2,4-(дитио)псевдоурацил, 5-(метил)-2,4-(дитио)псевдоурацил, 1-замещенный псевдоурацил, 1-замещенный 2(тио)-псевдоурацил, 1-замещенный 4-(тио)псевдоурацил, 1-замещенный 2,4-(дитио)псевдоурацил, 1-(аминокарбонилэтиленил)-псевдоурацил, 1-(аминокарбонилэтиленил)-2(тио)-псевдоурацил, 1-(аминокарбонилэтиленил)-4-(тио)псевдоурацил, 1-(аминокарбонилэтиленил)-2,4-(дитио)псевдоурацил, 1-(аминоалкиламинокарбонилэтиленил)-псевдоурацил, 1-(аминоалкиламинокарбонилэтиленил)-2(тио)-псевдоурацил, 1-(аминоалкиламинокарбонилэтиленил)-4-(тио)псевдоурацил, 1-(аминоалкиламинокарбонилэтиленил)-2,4-(дитио)псевдоурацил, 1,3-(диаза)-2-(оксо)-феноксазин-1-ил, 1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-феноксазин-1-ил, 1,3-(диаза)-2-(оксо)-фентиазин-1-ил, 1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-фентиазин-1-ил, 7-замещенный 1,3-(диаза)-2-(оксо)-феноксазин-1-ил, 7-замещенный 1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-феноксазин-1-ил, 7-замещенный 1,3-(диаза)-2-(оксо)-фентиазин-1-ил, 7-замещенный 1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-фентиазин-1-ил, 7-(аминоалкилгидрокси)-1,3-(диаза)-2-(оксо)-феноксазин-1-ил, 7-(аминоалкилгидрокси)-1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-феноксазин-1-ил, 7-(аминоалкилгидрокси)-1,3-(диаза)-2-(оксо)-фентиазин-1-ил, 7-(аминоалкилгидрокси)-1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-фентиазин-1-ил, 7-(гуанидинийалкилгидрокси)-1,3-(диаза)-2-(оксо)-феноксазин-1-ил, 7-(гуанидинийалкилгидрокси)-1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-феноксазин-1-ил, 7-(гуанидинийалкилгидрокси)-1,3-(диаза)-2-(оксо)-фентиазин-1-ил, 7-(гуанидинийалкилгидрокси)-1-(аза)-2-(тио)-3-(аза)-фентиазин-1-ил, 1,3,5-(триаза)-2,6-(диокса)-нафтален, инозин, ксантин, гипоксантин, нубуларин, туберцидин, изогуанизин, инозинил, 2-азаинозинил, 7-деазаинозинил, нитроимидазол, нитропиразол, нитробезимидазол, нитроиндазол, аминоиндолил, пирролопиримидинил, 3-(метил)изокарбостирилил, 5-(метил)изокарбостирилил, 3-(метил)-7-(пропинил)изокарбостирилил, 7-(аза)индолил, 6-(метил)-7-(аза)индолил, имидизопиридинил, 9-(метил)-имидизопиридинил, пирролопиримидинил, изокарбостирилил, 7-(пропинил)изокарбостирилил, пропинил-7-(аза)индолил, 2,4,5-(триметил)фенил, 4-(метил)индолил, 4,6-(диметил)индолил, фенил, нафталинил, антраценил, фенантраценил, пиренил, стильбенил, тетраценил, пентаценил, дифтортолуол, 4-(фтор)-6-(метил)бензимидазол, 4-(метил)бензимидазол, 6-(азо)тимин, 2-пиридинон, 5-нитроиндол, 3-нитропиррол, 6-(аза)пиримидин, 2-(амино)пурин, 2,6-(диамино)пурин, 5-замещенные пиримидины, N-замещенные пурины, N-замещенные пурины, O⁶-замещенные пурины, замещенные 1,2,4-триазолы, пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, 6-фенил-пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, пара-замещенный-6-фенил-пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, орто-замещенный-6-фенил-пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, бис-орто-замещенный-6-фенил-пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, пара-(аминоалкилгидрокси)-6-фенил-пирроло-пиримидин-2-он-3-ил, ор-

то-(аминоалкилгидрокси)-6-фенилпирролопиримидин-2-он-3-ил, бис-орто-(аминоалкилгидрокси)-6-фенилпирролопиримидин-2-он-3-ил, пиридопиримидин-3-ил, 2-оксо-7-аминопиридопиримидин-3-ил, 2-оксопиридопиримидин-3-ил или их любые О-алкилированные или N-алкилированные производные. В качестве альтернативы, можно использовать замещенные или модифицированные аналоги любого из вышеуказанных оснований и "универсальные основания".

Как используется в данном документе универсальное нуклеиновое основание представляет собой любое нуклеиновое основание, которое может образовывать пары со всеми четырьмя встречающимися в природе нуклеиновыми основаниями без существенного влияния на температуру плавления, распознавание внутриклеточными ферментами или активность дуплекса iRNA. Некоторые иллюстративные универсальные нуклеиновые основания включают без ограничения 2,4-дифтортолуол, нитропирролил, нитроиндолил, 8-аза-7-дезаадеин, 4-фтор-6-метилбензимидазол, 4-метилбензимидазол, 3-метил-изокарбостирлил, 5-метилизокарбостирлил, 3-метил-7-пропинилизокарбостирлил, 7-азаиндолил, 6-метил-7-азаиндолил, имидизопиридинил, 9-метил-имидизопиридинил, пирролопиризинил, изокарбостирлил, 7-пропинил изокарбостирлил, пропинил-7-азаиндолил, 2,4,5-триметилфенил, 4-метилюнолил, 4,6-диметилиндолил, фенил, нафталинил, антраценил, фенантраценил, пиренил, стильбенил, тетраценил, пентаценил, а также их структурные производные (см., например, Loakes, 2001, *Nucleic Acids Research*, 29, 2437-2447).

Дополнительные нуклеиновые основания включают такие как те, что раскрыты в патенте США № 3687808; раскрыты в Международной заявке № PCT/US09/038425, поданной 26 марта 2009 г.; раскрыты в *Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990; раскрыты English et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; раскрыты в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijin, P. Ed. Wiley-VCH, 2008; раскрыты Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993. Содержание всего вышеперечисленного включено в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание представляет собой нуклеиновое основание, которое довольно похоже по структуре на исходное нуклеиновое основание, такое как, например, 7-дезазапурин, 5-метилцитозин или G-зажим. В определенных вариантах осуществления миметик нуклеиновых оснований включает более сложные структуры, такие как, например, миметик трициклического феноксазинового нуклеинового основания. Способы получения указанных выше модифицированных нуклеиновых оснований хорошо известны специалистам в данной области.

Модификации нуклеиновых кислот (сахар).

Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, представленное в данном документе, может включать один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) мономеров, в том числе нуклеозид или нуклеотид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент. Например, фуранозильное сахарное кольцо нуклеозида может быть модифицировано при помощи ряда способов, в том числе без ограничения добавлением замещающей группы, связыванием двух негеминальных кольцевых атомов с образованием запертой нуклеиновой кислоты или бициклической нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления олигомерные соединения содержат один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) мономеров, которые представляют собой LNA.

В некоторых вариантах осуществления запертой нуклеиновой кислоты 2'-положение фуранозила соединено с 4'-положением при помощи линкера, выбранного независимо из $-[C(R1)(R2)]_n-$, $-[C(R1)(R2)]_n-O-$, $-[C(R1)(R2)]_n-N(R1)-$, $-[C(R1)(R2)]_n-N(R1)-O-$, $-[C(R1R2)]_n-O-N(R1)-$, $-C(R1)=C(R2)-O-$, $-C(R1)=N-$, $-C(R1)=N-O-$, $-C(=NR1)-$, $-C(=NR1)-O-$, $-C(=O)-$, $-C(=O)O-$, $-C(=S)-$, $-C(=S)O-$, $-C(=S)S-$, $-O-$, $-Si(R1)_2-$, $-S(=O)_x-$ и $-N(R1)-$;

где x равняется 0, 1 или 2;

n равняется 1, 2, 3 или 4;

каждый R1 и R2 независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил, C₁-C₁₂-алкил, замещенный C₁-C₁₂-алкил, C₂-C₁₂-алкенил, замещенный C₂-C₁₂-алкенил, C₂-C₁₂-алкинил, замещенный C₂-C₁₂-алкинил, C₅-C₂₀-арил, замещенный C₅-C₂₀-арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил, C₅-C₇-ациклический радикал, замещенный C₅-C₇-ациклический радикал, галоген, OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, COOJ1, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, CN, сульфонил (S(=O)₂-J1) или сульфоксил (S(=O)-J1); и

каждый J1 и J2 независимо представляет собой H, C₁-C₁₂-алкил, замещенный C₁-C₁₂-алкил, C₂-C₁₂-алкенил, замещенный C₂-C₁₂-алкенил, C₂-C₁₂-алкинил, замещенный C₂-C₁₂-алкинил, C₅-C₂₀-арил, замещенный C₅-C₂₀-арил, ацил (C(=O)-H), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, C₁-C₁₂-аминоалкил, замещенный C₁-C₁₂-аминоалкил или защитную группу.

В некоторых вариантах осуществления каждый из линкеров соединений LNA независимо представляет собой $-[C(R1)(R2)]_n-$, $-[C(R1)(R2)]_n-O-$, $-C(R1R2)-N(R1)-O-$ или $-C(R1R2)-O-N(R1)-$. В другом варианте осуществления каждый из указанных линкеров независимо представляет собой 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2',

4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-O-N(R1)-2' и 4'-CH₂-N(R1)-O-2', где каждый R1 независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂-алкил.

Некоторые LNA были получены и описаны в патентной литературе, а также в научной литературе (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; WO 94/14226; WO 2005/021570; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; примеры выданных патентов США и опубликованных заявок, в которых раскрываются LNA, включают, например, патенты США №№ 7053207; 6268490; 6770748; 6794499; 7034133; и 6525191; а также предварительные публикации США №№ 2004-0171570; 2004-0219565; 2004-0014959; 2003-0207841; 2004-0143114 и 20030082807.

В данном документе также представлены LNA, в которых 2'-гидроксильная группа кольца рибозил-сахара связана с 4'-атомом углерода сахарного кольца, тем самым образуя метиленокси (4'-CH₂-O-2') связь с образованием бициклического сахарного фрагмента (см. обзор Elayadi et al., Curr. Opin. Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8 1-7 и Orum et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; см. также патент США №№ 6268490 и 6670461). Связь может представлять собой метиленовую (-CH₂-) группу, соединяющую 2'-атом кислорода и 4'-атом углерода, для которой термин метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA используется для бициклической части; в случае этиленовой группы в этом положении используется термин этиленокси (4'-CH₂CH₂-O-2') LNA (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226). Метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA и другие аналоги бициклических сахаров демонстрируют очень высокие значения термической стабильности дуплекса с комплементарной ДНК и РНК (T_m=от +3 до +10°C), устойчивость к 3'-экзонуклеолитической деградаци и хорошие свойства растворимости. Описаны сильные и нетоксичные антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие BNA (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, 97, 5633-5638).

Изомер метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, который также рассматривался, представляет собой альфа-L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, которая, как было показано, обладает превосходной стабильностью в отношении 3'-экзонуклеазы. Альфа-L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA были включены в антисмысловые гзпмеры и химеры, которые проявляли сильную антисмысловую активность (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

Описаны синтез и получение мономеров метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, аденина, цитозина, гуанина, 5-метилцитозина, тимина и урацила, а также их свойства олигомеризации и распознавания нуклеиновых кислот (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). BNA и их получение также описаны в WO 98/39352 и WO 99/14226.

Также были получены аналоги метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, фосфотиоат-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA и 2'-тио-LNA (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). Также описано получение аналогов запертых нуклеозидов, содержащих олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы в качестве субстратов для полимераз нуклеиновых кислот (Wengel et al., WO 99/14226). Кроме того, в уровне техники был описан синтез 2'-амино-LNA, нового конформационно ограниченного высокоаффинного аналога олигонуклеотида (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Кроме того, были получены 2'-амино- и 2'-метиламино-LNA, и ранее сообщалось о термостойкости их дуплексов с комплементарными цепями РНК и ДНК.

Модифицированные сахарные фрагменты хорошо известны и могут использоваться для изменения, как правило, увеличения, аффинности антисмыслового соединения к его мишени и/или повышения устойчивости к нуклеазам. Репрезентативный перечень предпочтительных модифицированных сахаров включает без ограничения бициклические модифицированные сахара, в том числе метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA и этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2'-мостик) ENA; замещенные сахара, особенно 2'-замещенные сахара, содержащие замещающую группу 2'-F, 2'-OCH₃ или 2'-O(CH₂)₂-OCH₃; и 4'-тио-модифицированные сахара. Сахара также можно заменить, среди прочего, миметиками сахарных групп. Способы получения модифицированных сахаров хорошо известны специалистам в данной области. Некоторые репрезентативные патенты и публикации, в которых описывается получение таких модифицированных сахаров, включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; 5792747; 5700920; 6531584 и 6600032; а также WO 2005/121371.

Примеры модификаций "окси"-2' гидроксильной группы включают алкокси или арилокси (OR, например, R=H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG), O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂OR, n=1-50; "запертые" нуклеиновые кислоты (LNA), в которых фуранозная часть нуклеозида включает мостик, соединяющий два атома углерода на фуранозном кольце, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему; O-АМИН или O-(CH₂)_n АМИН (n=1-10, АМИН=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и O-CH₂CH₂(NCH₂CH₂NMe₂)₂-

Модификации "дезоксид" включают водород (например, сахара дезоксирибозы, которые имеют особое значение для одноцепочечных выступов); галоген (например, фтор); amino (например, NH₂; алкила-

мино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислота); $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -АМИН (АМИН= NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино); $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (R =алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); циано; меркапто; алкил-тио-алкил; тиоалкокси; тиоалкил; алкил; циклоалкил; арил; алкенил и алкинил, который может быть необязательно замещен, например, аминифункциональной группой.

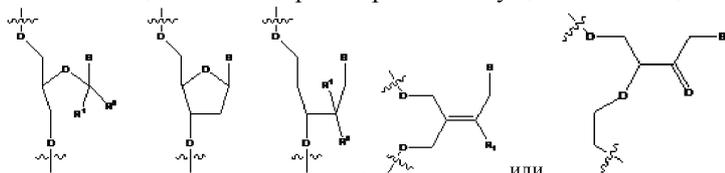
Другие подходящие 2'-модификации, например модифицированный МОЕ, описаны в публикации заявки на патент США № 20130130378, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Модификация в 2'-положении может присутствовать в конфигурации арабинозы. Термин "конфигурация арабинозы" относится к размещению заместителя в С2' рибозы в той же конфигурации, что и 2'-ОН в арабинозе.

Сахар может содержать две разные модификации у одного и того же атома углерода в сахаре, например, gem-модификацию. Сахарная группа также может содержать один или несколько атомов углерода, которые обладают стереохимической конфигурацией, противоположной таковой у соответствующего атома углерода в рибозе. Таким образом, олигомерное соединение может включать один или несколько мономеров, содержащих, например, арабинозу в качестве сахара. Мономер может иметь альфа-связь в 1'-положении на сахаре, например альфа-нуклеозиды. Мономер также может иметь противоположную конфигурацию в 4'-положении, например С5' и Н4' или заменяющие их заместители меняются местами. Когда С5' и Н4' или заменяющие их заместители меняются местами, считается, что сахар модифицирован в 4'-положении.

Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, раскрытое в данном документе, также может включать сахара с удаленным азотистым основанием, т.е. сахар, в котором отсутствует нуклеиновое основание в С-1' или присутствуют другие химические группы вместо нуклеинового основания в С1'. См., например, патент США № 5998203, содержание которого включено в данный документ в полном объеме. Такие сахара с удаленным азотистым основанием могут также дополнительно содержать модификации по одному или нескольким составляющим атомам сахара. Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению также может содержать один или несколько сахаров, которые представляют собой L-изомер, например L-нуклеозиды. Модификация сахарной группы также может предусматривать замену 4'-О серой, необязательно замещенные атом азота или группу CH_2 . В некоторых вариантах осуществления связь между С1' и нуклеиновым основанием имеет α -конфигурацию.

Модификации сахара также могут включать ациклические нуклеотиды, где С-С связь между атомами углерода рибозы (например, С1'-С2', С2'-С3', С3'-С4', С4'-О4' или С1'-О4') отсутствует и/или в нуклеотиде отсутствует по меньшей мере один из атомов углерода или атом кислорода рибозы (например, С1', С2', С3', С4' или О4') независимо или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления ацикли-



ческий нуклеотид представляет собой

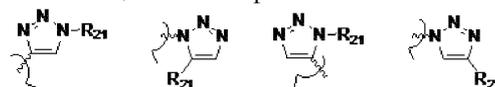
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R_1 и R_2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар.

В некоторых вариантах осуществления модификации сахара выбраны из группы, состоящей из 2'-H, 2'-O-Me (2'-O-метил), 2'-O-MOE (2'-O-метоксиэтил), 2'-F, 2'-O-[2-(метиламино)-2-оксоэтил] (2'-O-NMA), 2'-S-метил, 2'-O- CH_2 -(4'-C) (LNA), 2'-O- CH_2CH_2 -(4'-C) (ENA), 2'-O-аминопропил (2'-O-AP), 2'-O-диметиламиноэтил (2'-O-DMAOE), 2'-O-диметиламинопропил (2'-O-DMAP), 2'-O-диметиламиноэтилоксиэтил (2'-O-DMAEOE) и gem2'-OMe/2'F с 2'-O-Me в конфигурации арабинозы.

Следует понимать, что когда конкретный нуклеотид связан через свое 2'-положение со следующим нуклеотидом, описанные в данном документе модификации сахара могут быть помещены в 3'-положение сахара для этого конкретного нуклеотида, например нуклеотида, который связан через его 2'-положение. Модификация в 3'-положении может присутствовать в конфигурации ксилозы. Термин "конфигурация ксилозы" относится к размещению заместителя в С3' рибозы в той же конфигурации, что и 3'-ОН в сахаре ксилозе.

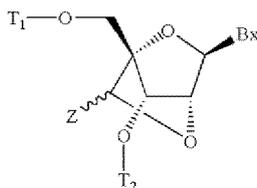
Водород, присоединенный к С4' и/или С1', может быть замещен линейным или разветвленным необязательно замещенным алкилом, необязательно замещенным алкенилом, необязательно замещенным алкинилом, где остов алкила, алкенила и алкинила может содержать один или несколько из O, S, S(O), SO_2 , $\text{N}(\text{R}')$, C(O), $\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{O}$, $\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}')$, $\text{CH}(\text{Z}')$, фосфорсодержащей связи, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного гетероциклического компонента или необязательно замещенного циклоалкила, где R' представляет собой водород, ацил или не-

обязательно замещенный алифатический компонент, Z' выбран из группы, состоящей из OR_{11} , COR_{11} ,


 CO_2R_{11} , $NR_{21}R_{31}$, $CONR_{21}R_{31}$, $CON(H)NR_{21}R_{31}$, $ONR_{21}R_{31}$, $CON(H)N=CR_{41}R_{51}$, $N(R_{21})C(=NR_{31})NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(O)NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(S)NR_{21}R_{31}$, $OC(O)NR_{21}R_{31}$, $SC(O)NR_{21}R_{31}$, $N(R_{21})C(S)OR_{11}$, $N(R_{21})C(O)OR_{11}$, $N(R_{21})C(O)SR_{11}$, $N(R_{21})N=CR_{41}R_{51}$, $ON=CR_{41}R_{51}$, SO_2R_{11} , SOR_{11} , SR_{11} , а также замещенного или незамещенного гетероциклического компонента; R_2i и R_3i для каждого случая независимо представляют собой водород, ацил, незамещенный или замещенный алифатический компонент, арил, гетероарил, гетероциклический компонент, OR_{11} , COR_{11} , CO_2R_{11} или $NR_{11}R_{11}'$; или R_{21} и R_{31} вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо; R_{41} и R_{51} в каждом случае независимо представляют собой водород, ацил, незамещенный или замещенный алифатический компонент, арил, гетероарил, гетероциклический компонент, OR_{11} , COR_{11} или CO_2R_{11} или $NR_{11}R_{11}'$; а R_{11} и R_{11}' независимо представляют собой водород, алифатический, замещенный алифатический компоненты, арил, гетероарил или гетероциклический компонент. В некоторых вариантах осуществления водород, присоединенный к $C4'$ $5'$ концевому нуклеотида, является замещенным.

В некоторых вариантах осуществления $C4'$ и $C5'$ вместе образуют необязательно замещенный гетероциклический компонент, предпочтительно содержащий по меньшей мере один $-PX(Y)-$, где X представляет собой H , OH , OM , SH , необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкокси, необязательно замещенный алкилтио, необязательно замещенный алкиламино или необязательно замещенный диалкиламино, где M независимо для каждого случая является щелочным металлом или переходным металлом с общим зарядом $+1$; а Y представляет собой O , S или NR' , где R' представляет собой водород, необязательно замещенный алифатический компонент. Предпочтительно эта модификация находится на $5'$ -конце $iRNA$.

В определенных вариантах осуществления LNA включают бициклический нуклеозид, имеющий формулу:



где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_1 представляет собой H или гидроксильную защитную группу;

T_2 представляет собой H , гидроксильную защитную группу или реактивную фосфорную группу;

Z представляет собой C_1-C_6 -алкил, C_2-C_6 -алкенил, C_2-C_6 -алкинил, замещенный C_1-C_6 -алкил, замещенный C_2-C_6 -алкенил, замещенный C_2-C_6 -алкинил, ацил, замещенный ацил или замещенный амид.

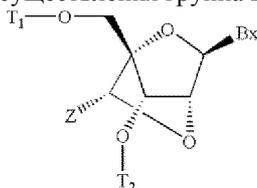
В некоторых вариантах осуществления каждая из замещенных групп независимо представляет собой моно- или полизамещенную необязательно защитными замещающими группами, независимо выбранными из галогена, оксо, гидроксила, $OJ1$, $NJ1J2$, $SJ1$, $N3$, $OC(=X)J1$, $OC(=X)NJ1J2$, $NJ3C(=X)NJ1J2$ и CN , где каждый $J1$, $J2$ и $J3$ независимо представляет собой H или C_1-C_6 -алкил, а X представляет собой O , S или $NJ1$.

В определенных вариантах осуществления каждая из замещенных групп независимо представляет собой моно- или полизамещенную замещающими группами, независимо выбранными из галогена, оксо, гидроксила, $OJ1$, $NJ1J2$, $SJ1$, $N3$, $OC(=X)J1$ и $NJ3C(=X)NJ1J2$, где каждый $J1$, $J2$ и $J3$ независимо представляет собой H , C_1-C_6 -алкил или замещенный C_1-C_6 -алкил, и X представляет собой O и $NJ1$.

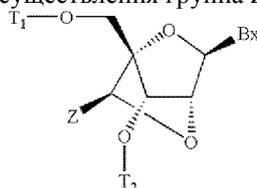
В определенных вариантах осуществления группа Z представляет собой C_1-C_6 -алкил, замещенный одним или несколькими Xx , где каждый Xx независимо представляет собой $OJ1$, $NJ1J2$, $SJ1$, $N3$, $OC(=X)J1$, $OC(=X)NJ1J2$, $NJ3C(=X)NJ1J2$ или CN ; где каждый $J1$, $J2$ и $J3$ независимо представляет собой H или C_1-C_6 -алкил, а X представляет собой O , S или $NJ1$. В другом варианте осуществления группа Z представляет собой C_1-C_6 -алкил, замещенный одним или несколькими Xx , где каждый Xx независимо представляет собой галоген (например, фтор), гидроксил, алкокси (например, CH_3O-), замещенный алкокси или азидо.

В определенных вариантах осуществления группа Z представляет собой $-CH_2Xx$, где каждый Xx представляет собой $OJ1$, $NJ1J2$, $SJ1$, $N3$, $OC(=X)J1$, $OC(=X)NJ1J2$, $NJ3C(=X)NJ1J2$ или CN ; где каждый $J1$, $J2$ и $J3$ независимо представляет собой H или C_1-C_6 -алкил, а X представляет собой O , S или $NJ1$. В другом варианте осуществления группа Z представляет собой $-CH_2Xx$, где каждый Xx представляет собой галоген (например, фтор), гидроксил, алкокси (например, CH_3O-) или азидо.

В определенных таких вариантах осуществления группа Z находится в (R)-конфигурации:



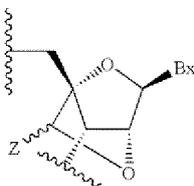
В определенных таких вариантах осуществления группа Z находится в (S)-конфигурации:



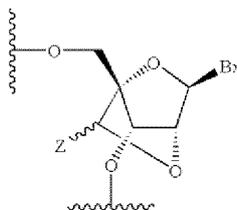
В определенных вариантах осуществления каждый T_1 и T_2 представляет собой гидроксильную защитную группу. Предпочтительный перечень гидроксильных защитных групп включает бензил, бензоил, 2,6-дихлорбензил, трет-бутилдиметилсилил, трет-бутилдифенилсилил, мезилат, тозилат, диметокситритил (DMT), 9-фенилксантин-9-ил (Pxl) и 9-(п-метоксифенил)ксантин-9-ил (MOX). В определенных вариантах осуществления T_1 представляет собой гидроксильную защитную группу, выбранную из ацетила, бензила, трет-бутилдиметилсилила, трет-бутилдифенилсилила и диметокситритила, где более предпочтительной гидроксильной защитной группой является T_1 , который представляет собой 4,4'-диметокситритил.

В определенных вариантах осуществления T_2 представляет собой реактивную фосфорную группу, где предпочтительные реактивные фосфорные группы включают диизопропилцианоэтоксифосфорамидит и Н-фосфонат. В определенных вариантах осуществления T_1 представляет собой 4,4'-диметокситритил, а T_2 представляет собой диизопропилцианоэтоксифосфорамидит.

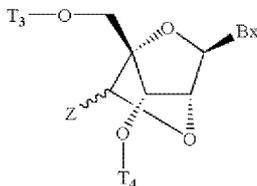
В определенных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один мономер с формулой:



или формулой:



или формулой:



где Vx представляет собой фрагмент гетероциклического основания;

T_3 представляет собой Н, гидроксильную защитную группу, связанную конъюгатную группу или межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к нуклеозиду, нуклеотиду, олигонуклеозиду, олигонуклеотиду, мономерной субъединице или олигомерному соединению;

T_4 представляет собой Н, гидроксильную защитную группу, связанную конъюгатную группу или межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к нуклеозиду, нуклеотиду, олигонуклеозиду, олигонуклеотиду, мономерной субъединице или олигомерному соединению;

где по меньшей мере один из T_3 и T_4 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к нуклеозиду, нуклеотиду, олигонуклеозиду, олигонуклеотиду, мономерной субъединице или олигомерному соединению; а также

Z представляет собой C_1 - C_6 -алкил, C_2 - C_6 -алкенил, C_2 - C_6 -алкинил, замещенный C_1 - C_6 -алкил, замещенный C_2 - C_6 -алкенил, замещенный C_2 - C_6 -алкинил, ацил, замещенный ацил или замещенный амид.

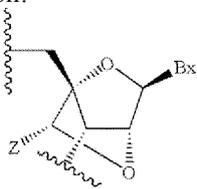
представляет собой H или C₁-C₆-алкил, а X представляет собой O, S или NJ1. В другом варианте осуществления каждая группа Z независимо представляет собой C₁-C₆-алкил, замещенный одним или несколькими Xx, где каждый Xx независимо представляет собой галоген (например, фтор), гидроксил, алкокси (например, CH₃O-) или азидо.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна группа Z представляет собой -CH₂Xx, где Xx представляет собой OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 или CN; где каждый J1, J2 и J3 независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил, и X представляет собой O, S или NJ1. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна группа Z представляет собой -CH₂Xx, где Xx представляет собой галоген (например, фтор), гидроксил, алкокси (например, CH₃O-) или азидо.

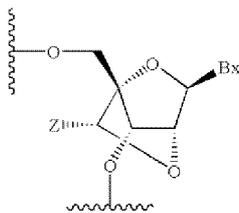
В определенных вариантах осуществления каждая группа Z независимо представляет собой -CH₂Xx, где каждый Xx независимо представляет собой OJ1, NJ1J2, SJ1, N3, OC(=X)J1, OC(=X)NJ1J2, NJ3C(=X)NJ1J2 или CN; где каждый J1, J2 и J3 независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил, а X представляет собой O, S или NJ1. В другом варианте осуществления каждая группа Z независимо представляет собой -CH₂Xx, где каждый Xx независимо представляет собой галоген (например, фтор), гидроксил, алкокси (например, CH₃O-) или азидо.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один Z представляет собой CH₃-. В другом варианте осуществления каждый Z представляет собой CH₃-.

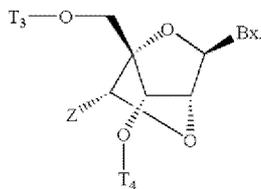
В определенных вариантах осуществления группа Z по меньшей мере одного мономера находится в (R)-конфигурации, представленной формулой:



или формулой:

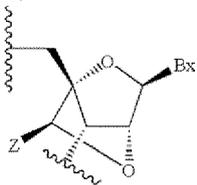


или формулой:

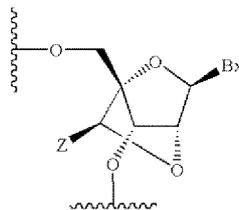


В определенных вариантах осуществления группа Z каждого мономера формулы находится в (R)-конфигурации.

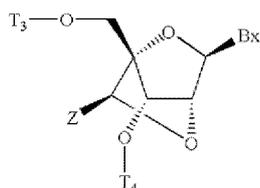
В определенных вариантах осуществления группа Z по меньшей мере одного мономера находится в (S)-конфигурации, представленной формулой:



или формулой:



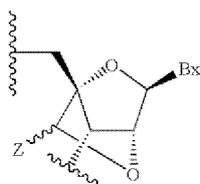
или формулой:



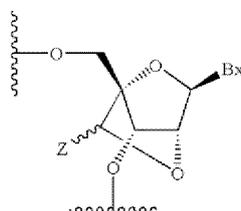
В определенных вариантах осуществления группа Z каждого мономера формулы находится в (S)-конфигурации.

В определенных вариантах осуществления T3 представляет собой H или гидроксильную защитную группу. В определенных вариантах осуществления T4 представляет собой H или гидроксильную защитную группу. В дополнительном варианте осуществления T3 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к нуклеозиду, нуклеотиду или мономерной субъединице. В определенных вариантах осуществления T4 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к нуклеозиду, нуклеотиду или мономерной субъединице. В определенных вариантах осуществления T3 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к олигонуклеозиду или олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления T4 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к олигонуклеозиду или олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления T3 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к олигомерному соединению. В определенных вариантах осуществления T4 представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, присоединенную к олигомерному соединению. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из T3 и T4 содержит межнуклеозидную связывающую группу, выбранную из фосфодиэфира или фосфотиоата.

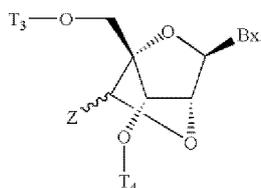
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один участок из по меньшей мере двух смежных мономеров с формулой:



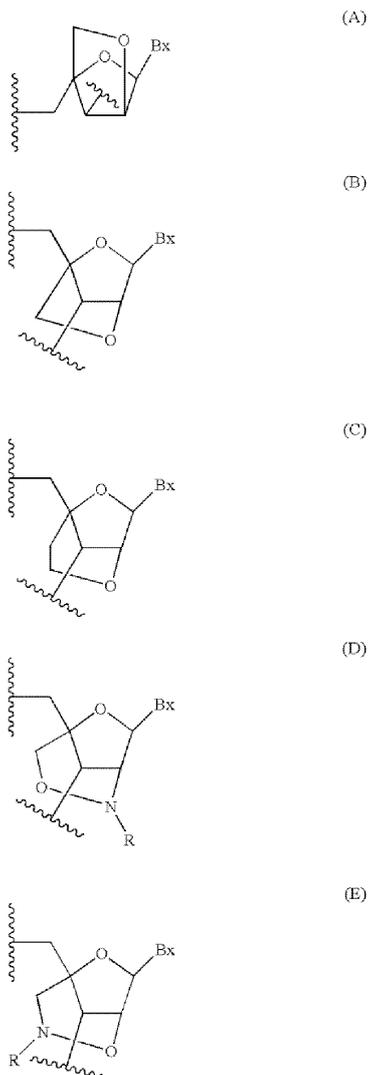
или формулой:



или формулой:

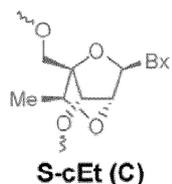


В некоторых вариантах осуществления LNA включают без ограничения (A) α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, (B) β -D-метиленокси (4'-CH₂-O-2') LNA, (C) этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2') LNA, (D) аминокси (4'-CH₂-O-N(R)-2') LNA и (E) оксиамино (4'-CH₂-N(R)-O-2') LNA, которые показаны ниже.



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере два участка из по меньшей мере двух смежных мономеров с вышеуказанной формулой. В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мотив с разрывом. В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один участок из от приблизительно 8 до приблизительно 14 смежных β -O-2'-дезоксирибофуранозилнуклеозидов. В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один участок из от приблизительно 9 до приблизительно 12 смежных β -O-2'-дезоксирибофуранозилнуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более) (S)-cEt мономер с формулой:



где Bx представляет собой фрагмент гетероциклического основания.

В определенных вариантах осуществления мономеры включают миметики сахара. В определенных вариантах осуществления миметик используется вместо сахара или комбинации сахар-межнуклеозидная связь и нуклеиновое основание сохраняется для гибридизации с выбранной мишенью. Репрезентативные примеры миметиков сахара включают без ограничения циклогексенил или морфолино. Типичные примеры миметика для комбинации сахар-межнуклеозидная связь включают без ограничения пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и морфолиногруппы, связанные незаряженными ахиральными связями. В

некоторых случаях вместо нуклеинового основания используется миметик. Репрезентативные миметики нуклеиновых оснований хорошо известны из уровня техники и включают без ограничения аналоги трициклического феноксазина и универсальные основания (Berger et al., Nuc Acid Res. 2000, 28:2911-14, включенный в данный документ посредством ссылки). Способы синтеза миметиков сахара, нуклеозидов и нуклеиновых оснований хорошо известны специалистам в данной области.

Модификации нуклеиновой кислоты (межсахарная связь)

В данном документе описаны связывающие группы, которые связывают мономеры (в том числе без ограничения модифицированные и немодифицированные нуклеозиды и нуклеотиды) вместе, образуя таким образом олигомерное соединение, например олигонуклеотид. Такие связывающие группы также называют межсахарными связями. Два основных класса связывающих групп определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие связи включают без ограничения сложные фосфодизэфиры (P=O), сложные фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидат и фосфотиоаты (P=S). репрезентативные не содержащие фосфор связывающие группы включают без ограничения метиленметилямино (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), сложный тиодизфир (-O-C(O)-S-), тионоккарбамат (-O-C(O)(NH)-S-); силоксан (-O-Si(H)₂-O-) и N,N'-диметилгидразин (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃-). Модифицированные связи по сравнению с природными фосфодизфирными связями можно использовать для изменения, как правило, повышения, устойчивости олигонуклеотидов к нуклеазам. В определенных вариантах осуществления связи, содержащие хиральный атом, могут быть получены как в виде рацемических смесей, так в виде отдельных энантиомеров. Репрезентативные хиральные связи включают без ограничения алкилфосфонаты и фосфотиоаты. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор связей хорошо известны специалистам в данной области.

Фосфатная группа в связывающей группе может быть модифицирована путем замены одного из атомов кислорода другим заместителем. Одним из результатов этой модификации может быть повышенная устойчивость олигонуклеотида к нуклеолитическому разрушению. Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфотиоат, фосфоселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфата, гидрофосфонаты, фосфорамидаты, алкил- или арилфосфонаты и сложные фосфотриэфиры. В некоторых вариантах осуществления один из не образующих мостик атомов кислорода фосфата в связи может быть замещен любым из следующих: S, Se, BR₃ (R представляет собой водород, алкил, арил), C (т.е. алкильная группа, арильная группа и др.), H, NR₂ (R представляет собой водород, необязательно замещенный алкил, арил) или OR (R представляет собой необязательно замещенный алкил или арил). Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из не образующих мостик атомов кислорода одним из указанных выше атомов или групп атомов делает атом фосфора хиральным; другими словами, атом фосфора в модифицированной таким образом фосфатной группе является стереогенным центром. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию "R" (в данном документе Rp) или конфигурацию "S" (в данном документе Sp).

В фосфодитиоатах оба не образующих мостик атома кислорода замещены серой. Фосфорный центр в фосфодитиоатах является ахиральным, что препятствует образованию диастереомеров олигонуклеотидов. Таким образом, не желая ограничиваться теорией, модификации обоих не образующих мостик атомов кислорода, которые устраняют хиральный центр, например образование фосфодитиоата, может быть желательным, поскольку они не могут давать смеси диастереомеров. Таким образом, не образующие мостик атомы кислорода могут независимо представлять собой любой из O, S, Se, B, C, H, N или OR (R представляет собой алкил или арил).

Фосфатный линкер также может быть модифицирован путем замены атома кислорода, образующего мостик (т.е. атома кислорода, который связывает фосфат с сахаром мономера), на атом азота (мостиговые фосфорамидаты), серы (мостиговые фосфотиоаты) и углерода (мостиговые метилфосфонаты). Замещение может происходить либо в одном из связывающих атомов кислорода, либо в обоих связывающих атомах кислорода. Когда мостиковым атомом кислорода является 3'-кислород нуклеозида, предпочтительно замещение на атом углерода. Когда мостиковым атомом кислорода является 5'-кислород нуклеозида, предпочтительно замещение на атом азота.

Модифицированные фосфатные связи, в которых по меньшей мере один атом кислорода, связанный с фосфатом, был замещен или фосфатная группа была замещена отличной от фосфатной группой, также называются "отличной от фосфодизфирной межсахарной связью" или "отличным от фосфодизфирного линкером".

В определенных вариантах осуществления фосфатная группа может быть замещена отличными от фосфорных соединителями, например дефосфо-линкерами. Дефосфо-линкеры в данном документе также называются отличными от фосфодизфирных линкерами. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что, поскольку заряженная фосфодизфирная группа является реакционным центром при нуклеолитической деградации, ее замещение нейтральными структурными миметиками должно обеспечивать повышенную устойчивость к нуклеазам. Опять же, не желая ограничиваться теорией, в некоторых вариантах осуществления может быть желательно внести изменения, в которых заряженная фосфатная группа замещена нейтральным фрагментом.

Примеры фрагментов, которые могут замещать фосфатную группу, включают без ограничения

амиды (например, амид-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5') и амид-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5')), гидроксиламино, силосан (диалкилсилосан), карбоксамид, карбонат, карбоксиметил, карбамат, карбоксилатный сложный эфир, тиоэфир, этиленоксидный линкер, сульфид, сульфонат, сульфонамид, сложный эфир сульфоновой кислоты, тиоформацеталь (3'-S-CH₂-O-5'), формацеталь (3'-O-CH₂-O-5'), оксим, метиленимино, метиленкарбониламино, метиленметилимино (ММІ, 3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), метиленгидразо, метилендиметилгидразо, метиленоксиметилимино, простые эфиры (C3'-O-C5'), тиоэфиры (C3'-S-C5'), тиоацетиамидо (C3'-N(H)-C(=O)-CH₂-S-C5', C3'-O-P(O)-O-SS-C5', C3'-CH₂-NH-NH-C5', 3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5' и 3'-NHP(O)(OCH₃)-O-5' и неионные связи, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH₂. См., например, Carbohydrate Modifications в Antisense Research; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook Eds. ACS Symposium Series 580; главы 3 и 4 (стр. 40-65). Предпочтительные варианты включают метиленметилимино (ММІ), метиленкарбониламино, амиды, карбамат и этиленоксидный линкер.

Специалисту в данной области хорошо известно, что в определенных случаях замена не образующего мостик атома кислорода может привести к усиленному расщеплению межсахарной связи соседним 2'-ОН, таким образом, во многих случаях модификация не образующего мостик атома кислорода может вызывать необходимость модификации 2'-ОН, например модификации, которая не участвует в расщеплении соседней межсахарной связи, например арабинозного сахара, 2'-О-алкила, 2'-F, LNA и ENA.

Предпочтительные отличные от фосфодиэфирных межсахарные связи включают фосфотиоаты, фосфотиоаты с по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более энантиомерного избытка изомера Sp, фосфотиоаты с по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более энантиомерного избытка изомера Rp, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминоксилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (например, метилфосфонат), селенофосфаты, фосфорамидаты (например, N-алкилфосфорамидат) и боранофосфонаты.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более и вплоть до всех) модифицированную или отличную от фосфодиэфирной связь. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более и вплоть до всех) фосфотиоатную связь.

Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению также может быть сконструировано таким образом, что фосфатный линкер и сахар замещены нуклеозидными или нуклеотидными заместителями, устойчивыми к нуклеазе. Не желая ограничиваться теорией, считается, что отсутствие повторно заряженного остова снижает связывание с белками, которые распознают полианионы (например, нуклеазы). Опять же, не желая ограничиваться теорией, в некоторых вариантах осуществления может быть желательно внести изменения, в которых основания связаны нейтральным остовом из заместителя. Примеры включают морфолино, циклобутил, пирролидин, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), аминоэтилглицил PNA (aegPNA) и заместители нуклеозидов пирролидина PNA с удлинённым остовом (berPNA). Предпочтительным заместителем является заместитель PNA.

Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, описанное в данном документе, может содержать один или несколько асимметричных центров и, таким образом, давать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные конфигурации, которые могут быть определены с точки зрения абсолютной стереохимии как (R) или (S), как, например, для аномеров сахара, или как (D) или (L), как, например, для аминокислот и др. В средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, представленному в данном документе, включены все такие возможные изомеры, а также их рацемические и оптически чистые формы.

Модификации нуклеиновой кислоты (концевые модификации).

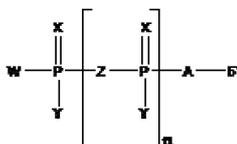
В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец антисмысловой цепи средства на основе двухцепочечной iRNA не содержит 5'-винилфосфонат (VP).

Концы средства на основе iRNA по настоящему изобретению могут быть модифицированы. Такие модификации могут быть с одного или обоих концов. Например, 3'- и/или 5'-концы iRNA могут быть конъюгированы с другими функциональными молекулярными единицами, такими как маркирующие фрагменты, например флуорофоры (например, пирен, TAMRA, флуоресцеин, красители Cy3 или Cy5) или защитные группы (основанные, например, на сере, кремнии, боре или сложном эфире). Функциональные молекулярные объекты могут быть присоединены к сахару через фосфатную группу и/или линкер. Концевой атом линкера может соединяться с или заменять связывающий атом фосфатной группы или C-3' или C-5' O, N, S или C группы сахара. В качестве альтернативы, линкер может соединяться с концевым атомом заместителя нуклеотида (например, PNA) или заменять его.

Когда массив линкер/фосфатно-функциональная молекулярная единица-линкер/фосфат помещается между двумя цепями двухцепочечного олигомерного соединения, этот массив может заменять петлю шпильки в олигомерном соединении шпильчатого типа.

Концевые модификации, применимые для модулирования активности, включают модификацию 5'-конца iRNA фосфатом или фосфатными аналогами. В определенных вариантах осуществления 5'-конец iRNA фосфорилирован или включает фосфорильный аналог. Иллюстративные 5'-фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Модификации на 5'-конце также могут быть применимы для стимуляции или подавления иммунной системы субъекта. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец олигомерного соединения содержит модифи-



кации , где каждый из W, X и Y независимо выбран из группы, состоящей из O, OR (R представляет собой водород, алкил, арил), S, Se, BR₃ (R представляет собой водород, алкил, арил), VN₃, C (т.е. алкильная группа, арильная группа и т.д.), H, NR₂ (R представляет собой водород, алкил, арил) или OR (R представляет собой водород, алкил или арил); каждый из A и Z независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой O, S, CH₂, NR (R представляет собой водород, алкил, арил) или необязательно замещенный алкилен, где остов алкилена может содержать один или несколько из O, S, SS и NR (R представляет собой водород, алкил, арил) в пределах олигомера и/или на конце; и n составляет 0-2. В некоторых вариантах осуществления n равняется 1 или 2. Понятно, что A замещает атом кислорода, связанный с 5' атомом углерода сахара. Когда n равняется 0, W и Y вместе с P, к которому они присоединены, могут образовывать необязательно замещенный 5-8-членный гетероциклический компонент, где каждый из W и Y независимо представляют собой O, S, NR' или алкилен. Предпочтительно гетероциклический компонент замещен арилом или гетероарилом. В некоторых вариантах осуществления один или оба водорода на C5' 5'-концевых нуклеотидов замещены галогеном, например F.

Иллюстративные 5'-модификации включают без ограничения 5'-монофосфат ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-монотиофосфат (фосфотиоат; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-монодитиофосфат (фосфодитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфотиолат ((HO)₂(O)P-S-5'); 5'-альфа-тиотрифосфат; 5'-бета-тиотрифосфат; 5'-гамма-тиотрифосфат; 5'-фосфорамидаты ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5'). Другие 5'-модификации включают 5'-алкилфосфонаты (R(OH)(O)P-O-5', R=алкил, например метил, этил, изоропил, пропил и др.), 5'-алкилэфирфосфонаты (R(OH)(O)P-O-5', R=алкилэфир, например метоксиметил (CH₂OMe), этоксиметил и др.). Другие иллюстративные 5'-модификации включают случаи, когда Z представляет собой необязательно замещенный алкил по меньшей мере в одном месте, например ((HO)₂(X)P-O[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5', ((HO)₂(X)P-O[-(CH₂)_a-P(X)(OH)-O]_b-5', ((HO)₂(X)P-[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5'; диалкильные концевые фосфаты и миметики фосфата: HO[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5', H₂N[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5', H[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5', Me₂N[-(CH₂)_a-O-P(X)(OH)-O]_b-5', HO[-(CH₂)_a-P(X)(OH)-O]_b-5', H₂N[-(CH₂)_a-P(X)(OH)-O]_b-5', H[-(CH₂)_a-P(X)(OH)-O]_b-5', Me₂N[-(CH₂)_a-P(X)(OH)-O]_b-5', где каждый из a и b независимо равняется 1-10. Другие варианты осуществления включают замену атома кислорода и/или серы VN₃, VN₃ и/или Se.

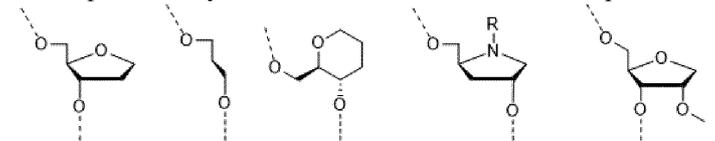
Концевые модификации также могут быть применимы для мониторинга распределения, и в таких случаях предпочтительные группы, которые необходимо добавить, включают флуорофоры, например флуоресцеин или краситель Alexa, например Alexa 488. Концевые модификации также могут быть применимы для увеличения поглощения, применимые модификации для этого включают нацеливающие лиганды. Концевые модификации также могут быть применимы для перекрестного связывания олигонуклеотида с другим фрагментом; модификации, применимые в данном случае, включают митомицин C, псорален и их производные.

Нарушающие термостабильность модификации.

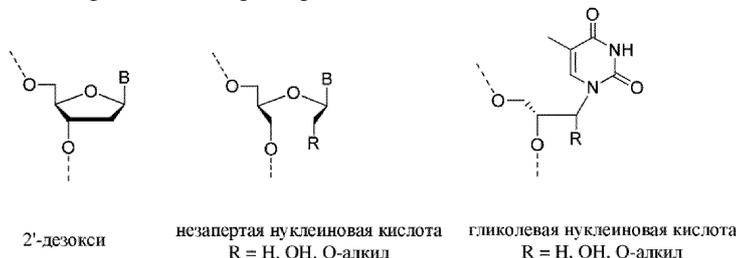
Соединения по настоящему изобретению, такие как iRNA и средства на основе dsRNA, можно оптимизировать для РНК-интерференции путем повышения подверженности iRNA-дуплекса диссоциации или плавлению (снижая свободную энергию ассоциации дуплекса) путем введения нарушающей термостабильность модификации в смысловую цепь в сайт, противоположный затравочному участку антисмысловой цепи (т.е., в положения 2-8 от 5'-конца антисмысловой цепи). Данная модификация может увеличивать подверженность дуплекса диссоциации или плавлению в затравочном участке антисмысловой цепи.

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

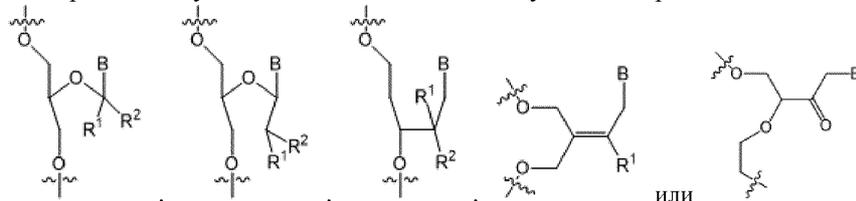
Иллюстративные модификации с удалением азотистого основания представляют собой:



Иллюстративные модификации сахаров представляют собой:

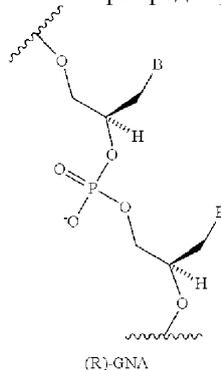


Термин "ациклический нуклеотид" относится к любому нуклеотиду с ациклическим рибозным сахаром, например, в котором любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует и/или в нуклеотиде отсутствует по меньшей мере один из атомов углерода или кислорода рибозы (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид представляет собой



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

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



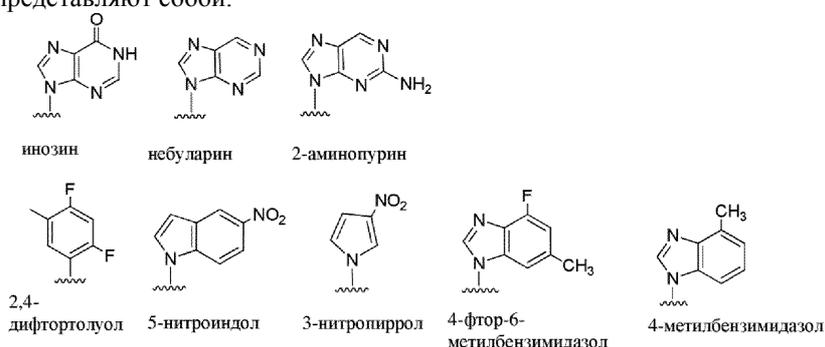
Нарушающая термостабильность модификация может представлять собой ошибочные спаривания (т.е. некомплементарные пары оснований) между нарушающим термостабильность нуклеотидом и противоположным нуклеотидом противоположной цепи dsRNA-дуплекса. Иллюстративные ошибочно спаренные пары оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинацию. Другие типы ошибочного спаривания оснований, известные из уровня техники, также применимы в настоящем изобретении. Может встречаться ошибочное спаривание между нуклеотидами, которые представляют собой как встречающиеся в природе нуклеотиды, так и модифицированные нуклеотиды, т.е. может встречаться ошибочное спаривание оснований у нуклеиновых оснований соответст-

вующих нуклеотидов независимо от модификаций, присутствующих в рибозных сахарах нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению, такие как средство на основе siRNA и ошибочно спаренной панели iRNA, содержат по меньшей мере одно нуклеиновое основание, которое представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание; например 2'-дезоксинуклеиновое основание в смысловой цепи.

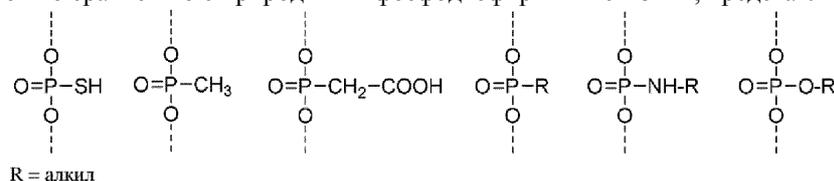
Большее число примеров нуклеотидов с удаленным азотистым основанием, модификаций в виде ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций, представляющих собой ошибочное спаривание, подробно описано в WO 2011/133876, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Нарушающие термостабильность модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями противоположной цепи, а также фосфатные модификации.

Модификации нуклеиновых оснований с ослабленной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи были исследованы в отношении дестабилизации центрального участка dsRNA-дуплекса, как описано в WO 2010/0011895, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:



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



В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению могут содержать 2'-5'-связи (с 2'-H, 2'-OH и 2'-OMe, а также с P=O или P=S). Например, модификации 2'-5'-связей можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой и антисмысловой цепей, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи для предупреждения активации смысловой цепи под действием RISC.

В другом варианте осуществления соединения по настоящему изобретению могут содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-OH и 2'-OMe). Например, такие модификации L-сахара можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой и антисмысловой цепей, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи для предупреждения активации смысловой цепи под действием RISC.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA конъюгируют с лигандом через носитель, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическая группа выбрана из остова из серинола или остова из диэтанолamina.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь средства на основе iRNA по настоящему изобретению, раскрытого в данном документе, является 5'-фосфорилированной или включает фосфорильный аналог на 5'(штрих)-конце. 5'-Фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-гуанозиновый кэп (7-метилованный или неметилованный) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозиновый кэп (Appp) и любую модифицированную или немодифицированную кэп-структуру нуклеотида (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

5'-монотиофосфат (фосфотиоат; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-моодитиофосфат (фосфодитиоат; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-фосфотиолат ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5'$); любую дополнительную комбинацию кислород/сера-замещенных монофосфата, дифосфата и трифосфатов (например, 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т.д.), 5'-фосфорамидаты ($(\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-алкилфосфонаты ($\text{R}=\text{алкил}=\text{метил}$, этил , изопропил , пропил и т. д., например, $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$), 5'-алкенилфосфонаты (т.е. винил, замещенный винил), $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$), 5'-алкилэфирфосфонаты ($\text{R}=\text{алкиловый эфир}=\text{метоксиметил}$ (MeOCH_2-), этоксиметил и т.д., например $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$).

Целевые гены.

Без ограничений целевые гены для siRNA включают без ограничения гены, способствующие нежелательной пролиферации клеток, ген фактора роста, ген рецептора фактора роста, гены экспрессии киназы, ген адаптерного белка, ген, кодирующий молекулу суперсемейства G-белок, ген, кодирующий фактор транскрипции, ген, опосредующий ангиогенез, вирусный ген, ген, необходимый для репликации вируса, клеточный ген, опосредующий вирусную функцию, ген бактериального патогена, ген амебного патогена, ген паразитарного патогена, ген грибного патогена, ген, который опосредует нежелательный иммунный ответ, ген, который опосредует обработку боли, ген, опосредующий неврологическое заболевание, ген аллена, обнаруженный в клетках, характеризующихся потерей гетерозиготности, или один аллельный ген полиморфного гена.

Конкретные иллюстративные целевые гены для siRNA включают без ограничения PCSK-9, ApoC3, AT3, AGT, ALAS1, TMPR, HAO1, AGT, C5, CCR-5, бета-ген PDGF; ген Erb-B, ген Src; ген CRK; ген GRB2; ген RAS; ген MEKK; ген JNK; ген RAF; ген Erk1/2; ген PCNA(p21); ген MYB; ген c-MYC; ген JUN; ген FOS; ген BCL-2; ген циклина D; ген VEGF; ген EGFR; ген циклина A; ген циклина E; ген WNT-1; ген бета-катенина; ген c-MET; ген PKC; ген NFKB; ген STAT3; ген сурвинина; ген Her2/Neu; ген топоизомеразы I; ген топоизомеразы II альфа; ген p73; ген p21(WAF1/CIP1), ген p27(K1P1); ген PPM1D; ген кавеолина I; ген MIB I; ген MTA1; ген M68; гены-супрессоры опухоли; ген p53; ген DN-p63; ген-супрессор опухоли pRb; ген-супрессор опухоли APC1; ген-супрессор опухоли BRCA1; ген-супрессор опухоли PTEN; гены слияния MLL, например MLL-AF9, ген слияния BCR/ABL; ген слияния TEL/AML1; ген слияния EWS/FLI1; ген слияния TLS/FUS1; ген слияния PAX3/FKHR; ген слияния AML1/ETO; ген альфа v-интегрин; ген рецептора Flt-1; ген тубулина; ген вируса папилломы человека, ген, необходимый для репликации вируса папилломы человека, ген вируса иммунодефицита человека, ген, необходимый для репликации вируса иммунодефицита человека, ген вируса гепатита А, ген, необходимый для репликации вируса гепатита А, ген вируса гепатита В, ген, необходимый для репликации вируса гепатита В, ген вируса гепатита С, ген, необходимый для репликации вируса гепатита С, ген вируса гепатита D, ген, необходимый для репликации вируса гепатита D, ген вируса гепатита Е, ген, необходимый для репликации вируса гепатита Е, ген вируса гепатита F, ген, необходимый для репликации вируса гепатита F, ген вируса гепатита G, ген, необходимый для репликации вируса гепатита G, ген вируса гепатита H, ген, необходимый для репликации вируса гепатита H, ген респираторно-синцитиального вируса, ген, необходимый для репликации респираторно-синцитиального вируса, ген вируса простого герпеса, ген, необходимый для репликации вируса простого герпеса, ген цитомегаловируса семейства герпесвирусов, ген, необходимый для репликации цитомегаловируса семейства герпесвирусов, ген вируса Эпштейна-Барр семейства герпесвирусов, ген, необходимый для репликации вируса Эпштейна-Барр семейства герпесвирусов, ген герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши, ген, необходимый для репликации герпесвируса, ассоциированного с саркомой Капоши, ген вируса JC, ген, необходимый для репликации вируса JC человека, ген миксовируса, ген, необходимый для репликации миксовируса, ген риновируса, ген, необходимый для репликации риновируса, ген коронавируса, ген, необходимый для репликации коронавируса, ген вируса Западного Нила, ген, необходимый для репликации вируса Западного Нила, ген вируса энцефалита Сент-Луис, ген, необходимый для репликации вируса энцефалита Сент-Луис, ген вируса клещевого энцефалита, ген, необходимый для репликации вируса клещевого энцефалита, ген вируса энцефалита долины Муррея, ген, необходимый для репликации вируса энцефалита долины Муррея, ген вируса денге, ген, необходимый для репликации вируса денге, ген вируса 40 обезьян, ген, необходимый для репликации вируса 40 обезьян, ген лимфотропного Т-клеточного вируса человека, ген, необходимый для репликации лимфотропного Т-клеточного вируса человека, ген вируса мышинного лейкоза Молони, ген, необходимый для репликации вируса мышинного лейкоза Молони, ген вируса энцефаломиокардита, ген, необходимый для репликации вируса энцефаломиокардита, ген вируса кори, ген, необходимый для репликации вируса кори, ген вируса Vericella zoster, ген, необходимый для репликации вируса Vericella zoster, ген аденовируса, ген, необходимый для репликации аденовируса, ген вируса желтой лихорадки, ген, необходимый для репликации вируса желтой лихорадки, ген полиовируса, ген, необходимый для репликации полиовируса, ген поксвируса, ген, необходимый для репликации поксвируса, ген плазмодия, ген, необходимый для репликации гена плазмодия, ген *Mycobacterium ulcerans*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium ulcerans*, ген *Mycobacterium tuberculosis*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium tuberculosis*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium leprae*, ген, необходимый для репликации *Mycobacterium leprae*, ген *Staphylococcus aureus*, ген, необходимый для репликации *Staphylococcus aureus*, ген *Streptococcus pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Streptococcus pneumoniae*, ген *Streptococcus pyogenes*,

ген, необходимый для репликации *Streptococcus pyogenes*, ген *Chlamydia pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Chlamydia pneumoniae*, ген *Mycoplasma pneumoniae*, ген, необходимый для репликации *Mycoplasma pneumoniae*, ген интегрин, ген селектина, ген системы комплемента, ген хемокина, ген рецептора хемокина, ген GCSF, ген Gro1, ген Gro2, ген Gro3, ген PF4, ген MIG, ген основного белка тромбоцитов, ген MIP-1I, ген MIP-1J, ген RANTES, ген MCP-1, ген MCP-2, ген MCP-3, ген SMBKR1, ген SMBKR2, ген SMBKR3, SMBKR5v, ген AIF-1, ген I-309, ген компонента ионного канала, ген нейротрансмиттерного рецептора, ген нейротрансмиттерного лиганда, ген семейства амилоидов, ген презенилина, ген HD, ген DRPLA, ген SCA1, ген SCA2, ген MJD1, ген CACNL1A4, ген SCA7, ген SCA8, аллельный ген, обнаруженный при потере гетерозиготности клеток (LOH), один аллельный ген полиморфного гена и их комбинации.

Потеря гетерозиготности (LOH) может привести к гемизиготности для последовательности, например, генов в области LOH. Это может привести к значительному генетическому различию между нормальными клетками и клетками в болезненном состоянии, например раковыми клетками, и обеспечивает применимое различие между нормальными клетками и клетками в болезненном состоянии, например раковыми клетками. Это различие может возникать из-за того, что ген или другая последовательность гетерозиготны в диплоидных клетках, но гемизиготны в клетках, имеющих LOH. Участки LOH часто будут включать ген, потеря которого способствует нежелательной пролиферации, например ген-супрессор опухоли, и другие последовательности, включая, например, другие гены, в некоторых случаях ген, который необходим для нормальной функции, например роста. Способы по настоящему изобретению частично основаны на специфической модуляции одного аллеля необходимого гена при помощи композиции по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухцепочечной iRNA, которое модулирует микро-РНК.

Нацеливание на ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацелено на APP при семейной болезни Альцгеймера с ранним началом, ATXN2 при спиноцеребеллярной атаксии 2 и ALS и C9orf72 при боковом амиотрофическом склерозе и лобно-височной деменции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацелено на TARDBP при ALS, MAPT (Tau) при лобно-височной деменции и HTT при болезни Хантингтона.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацелено на SNCA при болезни Паркинсона, FUS при ALS, ATXN3 при спиноцеребеллярной атаксии 3, ATXN1 при SCA1, гены при SCA7 и SCA8, ATN1 при DRPLA, MeCP2 при XLMR, PRNP при прионной болезни, рецессивных нарушениях ЦНС: болезни Лафора, DMPK при DM1 (ЦНС и скелетная мускулатура), а также TTR при hATTR (ЦНС, глазная и системная).

Спиноцеребеллярная атаксия представляет собой наследственное нарушение функции мозга. Доминантно наследуемые формы спиноцеребеллярной атаксии, такие как SCA1-8, являются истощающими заболеваниями при отсутствии модифицирующей болезнь терапии. Примеры целевых заболеваний включают SCA2, SCA3 и SCA1.

Нацеливание на ATXN2 при SCA2.

Спиноцеребеллярная атаксия 2 (SCA2), прогрессирующая атаксия, является второй по распространенности SCA. Еще одно заболевание, связанное с этой мишенью, представляет собой боковой амиотрофический склероз (ALS). Эти заболевания истощают и в конечном итоге приводят к летальному исходу без модифицирующей болезнь терапии. Распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; ATXN2 вызывает 15% заболеваемости в популяции со SCA во всем мире и намного больше в популяциях со SCA в некоторых странах, особенно на Кубе (40 на 100000 человек). Нацеливание на ATXN2 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в ATXN2 при семейных и спорадических SCA и ALS, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга или мозжечок. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения ATXN2 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка и гибель клеток Пуркиньи и нейронов. Эффективность была продемонстрирована 70% нокдауном (KD) mRNA ATXN2; и продемонстрировано mATXN2 KD РОС мышей. Что касается безопасности, мыши с нокаутом mATXN2 (KO) были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на ATXN3 при SCA3.

Спиноцеребеллярная атаксия 3 (SCA3), прогрессирующая атаксия, является наиболее распространенной SCA во всем мире. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезнь терапии. Это наиболее частая причина SCA, и распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; ATXN3 вызывает 21% заболеваемости в популяции со SCA в США и гораздо больше в Европе, особенно в Португалии. Нацеливание на ATXN3 может быть успешным при

применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в ATXN3 при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга или мозжечок. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения ATXN3 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка, гибель клеток Пуркинье и нейронов. Эффективность была продемонстрирована 70% KD mRNA ATXN3; и продемонстрировано mATXN3 KD РОС мышей. Что касается безопасности, мыши с КО mATXN3 были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на ATXN1 при SCA1.

Спиноцеребеллярная атаксия 1 (SCA1), прогрессирующая атаксия, является первым геном SCA, обнаруженным в 1993 году. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; ATXN1 вызывает 6% заболеваемости в популяции со SCA в США и во всем мире и гораздо больше в некоторых странах (25% в Японии), особенно в Польше (64%) и Сибири (100%). Нацеливание на ATXN1 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в ATXN1 при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга или мозжечок. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения ATXN1 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка, гибель клеток Пуркинье и нейронов. Эффективность была продемонстрирована 70% KD mRNA ATXN1; и продемонстрировано mATXN1 РОС мышей. Что касается безопасности, мыши с КО mATXN1 были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на ATXN7 при SCA7

Спиноцеребеллярная атаксия 7 (SCA7) вызывает прогрессирующую атаксию и дегенерацию сетчатки. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальным заболеваниям сетчатки и мозжечка без модифицирующей болезни терапии. Распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; ATXN7 вызывает 5% заболеваемости в популяции со SCA во всем мире, а в некоторых странах, особенно в Южной Африке, гораздо больше. Нацеливание на ATXN7 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в ATXN7 при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга, мозжечок или сетчатка. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения ATXN1 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка, провоцируя дистрофию колбочек и палочек, гибель клеток Пуркинье и нейронов. Эффективность была продемонстрирована 70% KD mRNA ATXN1 при интратекальном (IT) и интравитреальном (IVT) введении. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на ATXN8 при SCA8.

Спиноцеребеллярная атаксия 8 (SCA8), прогрессирующая нейродегенеративная атаксия, вызывается размножением повторов CTG в ATXN8. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; ATXN8 вызывает 3% заболеваемости в популяции со SCA во всем мире, а в некоторых странах, особенно в Финляндии, гораздо больше. Нацеливание на ATXN8 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CTG в ATXN8 при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга или мозжечок. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CTG-размножения ATXN8 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка, провоцируя гибель клеток Пуркинье и нейронов. Эффективность продемонстрирован 70% KD mRNA ATXN8. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CTG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на CACNA1A при SCA6.

Спиноцеребеллярная атаксия 6 (SCA6) представляет собой прогрессирующую атаксию. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность SCA составляет 2-6 на 100000 человек; и CACNA1A вызывает 15% заболеваемости в популяции со SCA во всем мире. Нацеливание на CACNA1A может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в CACNA1A при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга или мозжечок. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения CACNA1A вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого

белка и гибель клеток Пуркинье и нейронов. Эффективность была продемонстрирована 70% KD Mra CAG-размножения CACNA1A. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Иллюстративные целевые заболевания среди наследственных полиглутаминовых нарушений включают болезнь Хантингтона (HD).

Нацеливание на HTT при болезни Хантингтона.

Мутации Хантингтона вызывают HD, прогрессирующее дегенеративное заболевание ЦНС. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность HD составляет 5-10 на 100000 человек во всем мире, и гораздо чаще встречается в некоторых странах, в частности в Венесуэле. Нацеливание на HTT может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в HTT при семейных и спорадических HD, в таких тканях, как полосатое тело и кора головного мозга. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения HTT вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка и гибель нейронов. Эффективность продемонстрирована только 70% KD CAG-размножения HTT; и продемонстрировано ПОС мышей. Что касается безопасности, КО HTT у мышей может быть летальным; KD у людей был продемонстрирован. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки с пептидными повторами в CSF.

Нацеливание на ATN1 при DRPLA.

Мутации атрофина 1 вызывают дентаторубральную-паллидолизанскую атрофию (DRPLA), которая является прогрессирующим спиноцеребеллярным заболеванием, сходным с HD. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность DRPLA составляет 2-7 на 100000 человек в Японии. Нацеливание на ATN1 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CAG в ATN1 при семейных и спорадических SCA, в таких тканях, как спинной мозг, ствол мозга, мозжечок или кора головного мозга. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантное кодирование CAG-размножения ATN1 вызывает экспрессию токсичного, неправильно свернутого белка и гибель нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD ATN1. Что касается безопасности, мышцы с КО ATN1 были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на AR при спинальной и бульварной мышечной атрофии.

Мутации рецепторов андрогенов вызывают спинальную и бульварную мышечную атрофию (SBMA, болезнь Кеннеди), заболевание с прогрессирующим истощением мышц и другие заболевания. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность SBMA составляет 2 на 100000 мужчин; у женщин наблюдается умеренный фенотип. Нацеливание на AR может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, кодирование размножения CAG-повторов в AR обнаружено при семейном SBMA, в таких тканях, как спинной мозг или ствол мозга. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что X-сцепленное размножение CAG AR вызывает токсическое усиление или функцию и гибель мотонейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD AR. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA CAG CSF и белки с пептидными повторами.

Нацеливание на FXN при атаксии Фридрейха

Рецессивная потеря функции GAA-размножения FXN вызывает атаксию Фридрейха (FA), прогрессирующую дегенеративную атаксию. Это заболевание истощает и в конечном итоге приводит к летальному исходу без модифицирующей болезни терапии. Распространенность FA составляет 2 на 100000 человек во всем мире. Нацеливание на FXN может быть успешным при помощи молекулярной генетики человека, например, размножение интронного повтора GAA в FXN было обнаружено при семейной FA, в таких тканях, как спинной мозг, мозжечок или, возможно, сетчатка и сердце. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-рецессивное размножение некодирующей FAA FXN вызывает снижение экспрессии FXN, важного митохондриального белка. Эффективность была продемонстрирована 70% KD размножения GAS интрона FXN. Что касается безопасности, KD интрона GAA безопасен и эффективен у мышей. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки с пептидными повторами в CSF.

Нацеливание на FMR1 при FXTAS.

Тремор/атаксия, ассоциированные с ломкой X-хромосомы (FXTAS), прогрессирующее нарушение атаксии и когнитивной потери у взрослых, вызванное сверхэкспрессией FMR1. Это заболевание является истощающим без модифицирующей болезни терапии. Распространенность пермутации FMR1 представ-

ляет собой 1 на 500 мужчин. Нацеливание на FMR1 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, были обнаружены пре-мутации размножения кодирующих повторов CCG в FMR1 при FXTAS, в таких тканях, как спинной мозг, мозжечок или кора головного мозга. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что X-сцепленное размножение CCG FMR1 приводит к токсической mRNA. Эффективность продемонстрирована 70% KD токсической mRNA. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки с пептидными повторами в CSF.

Нацеливание выше FMR1 при синдроме ломкой X-хромосомы.

Синдром ломкой X-хромосомы (FRAXA), прогрессирующее нарушение с умственной отсталостью, можно подвергать лечению путем воздействия на вышележащую mRNA FMR1. Это заболевание является истощающим без модифицирующей болезни терапии. Распространенность FRAXA составляет 1 на 4000 у мужчин и 1 на 8000 у женщин. Нацеливание на FMR1 может быть успешным при применении молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение кодирующих повторов CCG в FMR1 при FRAXA, в таких тканях, как ЦНС. Механизм этого нацеливания может заключаться в том, что X-связанное размножение кодирующих CCG FMR1 вызывает LOF; и нормальные функции FMR1 по транспортировке специфических mRNA из ядра. Эффективность продемонстрирована 70% KD токсической mRNA. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки с пептидными повторами в CSF.

Доминантно наследуемый боковой амиотрофический склероз является истощающим заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Примеры мишеней включают C9orf72, ATXN2 (также вызывает SCA2) и MAPT.

Нацеливание на C9orf72 при ALS.

C9orf72 является наиболее частой причиной бокового амиотрофического склероза (ALS) и лобно-височной деменции (FTD). Эти заболевания представляют собой летальные нарушения двигательных нейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность ALS составляет 2-5 на 100000 человек (10% - семейные); C9orf72 вызывает 39% семейного ALS в США и Европе и 7% спорадического ALS. Нацеливание на C9orf72 может быть успешным с применением методик молекулярной генетики человека, например, было обнаружено размножение гекса-нуклеотида при семейном и спорадическом ALS, в тканях, таких как верхние и нижние двигательные нейроны (при ALS) или кора головного мозга (при FTD). Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутомно-доминантная размножение гекса-нуклеотида вызывает ассоциированную с повторами He-AUG-зависимую трансляцию токсичных белков с дипептидными повторами и гибель нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD C9orf72. Что касается безопасности, гетерозиготные мутации LOF C9orf72, по-видимому, безопасны для людей и мышей. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA гексануклеотидных повторов и белки с дипептидными повторами в CSF.

Нацеливание на TARDBP при ALS.

Мутации TARDBP вызывают ALS и лобно-височную деменцию (FTD). Эти заболевания представляют собой летальные нарушения двигательных нейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность ALS составляет 2-5 на 100000 человек (10% - семейные); TARDBP вызывает 5% семейного ALS и 1,5% спорадического ALS. Нацеливание на TARDBP может быть успешным с применением методик молекулярной генетики человека, например, были обнаружены мутации при семейном и спорадическом ALS, в тканях, таких как верхние и нижние двигательные нейроны (при ALS) или кора головного мозга (при FTD). Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутомно-доминантные мутации TRDBP вызывают синтез токсического белка TRDBP и гибель нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD мутантных аллелей TARDBP. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, белки в CSF.

Нацеливание на FUS при ALS.

Мутации FUS вызывают ALS и FTD. Эти заболевания представляют собой летальные нарушения двигательных нейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность ALS составляет 2-5 на 100000 человек (10% - семейные); FUS вызывает 5% случаев семейного ALS; включения FUS часто встречаются при спорадическом ALS. Нацеливание на FUS может быть успешным с применением методик молекулярной генетики человека, например, были обнаружены мутации при семейном ALS, в тканях, таких как верхние и нижние двигательные нейроны при ALS. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутомно-доминантные мутации FUS вызывают аномальное сворачивание белка и летальность нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD мутантных аллелей FUS. Что касается безопасности, мыши KO подвержены заболеванию, но выживают и имеют фенотип ADHD. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, белки в CSF.

Нацеливание на SOD1 при ALS.

Доминантные и рецессивные мутации SOD1 вызывают ALS. Это заболевание представляет собой летальное нарушение двигательных нейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность ALS составляет 2-5 на 100000 человек (10% - семейный); SOD1 вызывает 5-20% случаев семейного ALS. Нацеливание на SOD1 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, многие мутации SOD1 ассоциируются с AD и AR ALS в семьях, в тканях, таких как верхние и нижние двигательные нейроны при ALS. Для эффективности этого нацеливания может потребоваться специфический для мутации KD. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры могут быть специфическими для мутации.

Доминантно наследуемая лобно-височная деменция и прогрессирующий супрануклеарный паралич. Мишени включают MAPT, поскольку он может быть важен при AD, или C9orf72.

Нацеливание на белок Тау, связанный с микротрубочками, при FTD-17 и PSP.

Семейная лобно-височная деменция 17 (FTD-17), семейная форма FTD, связанная с хромосомой 17, и семейный прогрессирующий супрануклеарный паралич могут быть вызваны мутациями MAPT, которые также могут вызывать редкие формы прогрессирующего супрануклеарного паралича, кортикобазальной дегенерации, Таупатию с дыхательной недостаточностью, деменцию с судорогами. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность FTD составляет 15-22 на 100000 человек; распространенность FTD-17 в Нидерландах составляет 1 на 100000 населения. Нацеливание на MAPT может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, были обнаружены точечные мутации GOF и мутации сайта сплайсинга MAPT при семейных и спорадических случаях FTD, в таких тканях, как лобная или височная кора. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантные мутации GOF в MAPT приводят к токсическим Тау-пептидам и гибели нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD MAPT. Что касается безопасности, мыши с KO MAPT были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA Тау и белки в CSF.

Нацеливание на секвестосом-1 при FTD и ALS.

Спорадические FTD/ALS связаны с доминантными мутациями SQSTM1. Это заболевание является летальным нейродегенеративным заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Это очень редкое заболевание. Нацеливание на секвестосом-1 целесообразно путем молекулярно-генетической ассоциации в спорадических случаях в таких тканях, как лобная и височная кора или мозжечок и спинной мозг. Возможный диагноз включает генетическое тестирование; ранние симптомы.

Доминантно наследуемая болезнь Паркинсона является истощающим заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Мишени включают SNCA.

Нацеливание на SNCA при болезни Паркинсона.

Мутации альфа-синуклеина вызывают случаи семейной болезни Паркинсона (PD) и болезнь диффузных телец Леви. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность PD составляет 4 млн человек во всем мире; 1/3 PD случаев относится к семейным; 1% fPD вызван SNCA. Нацеливание на SNCA может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации и дупликации SNCA вызывают случаи семейной PD в таких тканях, как продолговатый мозг или черная субстанция среднего мозга. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что сверхэкспрессия или экспрессия аномального белка SNCA приводит к синтезу токсических пептидов и гибели нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD SNCA. Что касается безопасности, мыши с KO SNCA были здоровыми.

Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA SNCA и белки в CSF.

Нацеливание на LRRK2 при болезни Паркинсона.

Мутации богатой лейцином повторной киназы 2 вызывают случаи семейной болезни Паркинсона. Это заболевание является летальным нейродегенеративным заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность PD составляет 4 миллиона человек во всем мире; 1/3 PD случаев относится к семейным; 3-7% fPD вызван LRRK2. Нацеливание на LRRK2 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации LRRK2 вызывают случаи семейной PD в таких тканях, как продолговатый мозг или черная субстанция среднего мозга. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в CSF.

Нацеливание на GARS при спинальной мышечной атрофии V.

Аутосомно-доминантные мутации глицил-tRNA синтетазы вызывают спинальную мышечную атрофию V (SMAV) или дистальную наследственную моторную нейропатию Va. Эти заболевания представляют собой нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Они являются очень редкими заболеваниями. Нацеливание на GAR может быть эффективным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации GARS вызывают случаи семей-

ной SMA в таких тканях, как спинной мозг. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы.

Нацеливание на сейпин при спинальной мышечной атрофии.

Аутосомно-доминантные мутации сейпина вызывают спинальную мышечную атрофию (SMA) или дистальную наследственную моторную нейропатию. Эти заболевания представляют собой нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Они являются очень редкими заболеваниями. Нацеливание на сейпин может быть эффективным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации сейпина вызывают случаи семейной SMA в таких тканях, как спинной мозг. Механизм этого нацеливания, вероятно, связан с GOF и токсичными пептидами. Эффективность продемонстрирована 50% KD. Что касается безопасности, рецессивные мутации LOF вызывают прогрессирующую энцефалопатию с липодистрофией или без нее. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы.

Доминантно наследуемая болезнь Альцгеймера является истощающим заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Мишени включают APP из-за центральной механистической роли в случаях семейного заболевания и возможной роли в общих случаях AD.

Нацеливание на APP при болезни Альцгеймера.

Мутации белка-предшественника амилоида вызывают раннее начало семейной болезни Альцгеймера (EOFAD); AD при синдроме Дауна; или AD. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность EOFAD-APP составляет 1% AD; распространенность трисомии 21 составляет 1% AD; а распространенность AD составляет приблизительно 2,5-5 миллионов в США. Нацеливание на APP может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, дупликации APP и точечные мутации вызывают EOFAD в таких тканях, как кора головного мозга или гиппокамп. Механизм этого нацеливания может заключаться в том, что сверхэкспрессия APP или экспрессия токсичных метаболитов вызывает прогрессирующую гибель нейронов. Эффективность продемонстрирована 70% KD APP. Что касается безопасности, сообщается, что мыши KD здоровы с некоторыми отклонениями в поведении; Сообщалось, что мыши KD здоровы с некоторыми дефектами пространственной памяти. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы или MRI. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA APP и пептиды в CSF.

Нацеливание на PSEN1 при болезни Альцгеймера.

Мутации пресенилина 1 вызывают раннее начало семейной болезни Альцгеймера (EOFAD); или AD. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Нацеливание на PSEN1 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации PSEN1 вызывают EOFAD в таких тканях, как кора головного мозга или гиппокамп. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантные мутации PSEN1 вызывают аномальный метаболизм APP, а токсические пептиды вызывают прогрессирующую гибель нейронов. Эффективность, продемонстрированная KD APP, может устранить необходимость в PSEN1-специфичной терапии. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы или MRI. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, PSEN1 и пептиды APP в CSF.

Нацеливание на PSEN2 при болезни Альцгеймера.

Мутации пресенилина 2 вызывают раннее начало семейной болезни Альцгеймера (EOFAD); или AD. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Нацеливание на PSEN2 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации PSEN2 вызывают EOFAD в таких тканях, как кора головного мозга или гиппокамп. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантные мутации PSEN2 вызывают аномальный метаболизм APP, а токсические пептиды вызывают прогрессирующую гибель нейронов. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование; ранние симптомы или MRI.

Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, PSEN2 и пептиды APP в CSF.

Нацеливание на Apo E при болезни Альцгеймера.

Аполипопротеин E4 связан со спорадической AD у пожилых людей. Это заболевание является летальным нейродегенеративным заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность AD в США составляет 2,5-5 млн человек. Нацеливание на Apo E может быть эффективным, ввиду того, что геномные данные, подтверждающие связь между ApoE4 и AD, отлично представлены во многих популяциях. Целевой тканью может быть кора головного мозга. Пока неясно, вносит ли Apo E4 вклад в патогенез AD, несмотря на сильную взаимосвязь во многих популяциях. К настоящему времени данные показывают, что гомозиготность Apo E4 указывает на повышенный риск AD у пожилых людей, но недостаточна для того, чтобы вызвать AD, даже у пожилых людей. Что касается безопасности, KD Apo E в ЦНС может быть безопасным, поскольку мутации LOF человека в Apo E не связаны с очевидными неврологическими дефектами, хотя системное воздействие может вызвать гиперлипопротеинемию III типа. Возможный диагноз включает клинический диагноз AD; исключение мутации EOFAD;

генетическое тестирование генотипа Apo E4. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA APP, Tau и пептиды в CSF.

Нарушения ЦНС, связанные с дупликацией генов. Последовательный KD наполовину может облегчить эти нарушения. Мишени включают MeCP2.

Нацеливание на MeCP2 при синдроме ломкой X-хромосомы.

Дупликация гена метил-СpG-связывающего белка 2 вызывает синдром ломкой X-хромосомы (XLMR). Это заболевание является летальным когнитивным заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. 1-15% случаев синдрома ломкой X-хромосомы вызвано дупликацией MeCP2; у 2-3% населения есть MR. Нацеливание на MeCP2 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, дупликация MeCP2 вызывает XLMR в тканях, таких как кора головного мозга. Механизм этого нацеливания может заключаться в том, что сверхэкспрессия MeCP2 вызывает нарушение регуляции другого гена и нейродегенерацию. Эффективность была продемонстрирована 50% KD MeCP2; и KD ASO в моделях мышей с измененным фенотипом. Что касается безопасности, мутации MeCP2 LOF могут вызывать синдром Ретта. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA MeCP2 и пептиды в CSF.

Доминантно наследуемая церебральная амилоидная ангиопатия является истощающим заболеванием при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Мишени предусматривают TTR.

Нацеливание на TTR при hATTR CAA.

Это нацеливание может представлять собой введение siRNA в ЦНС с низким риском. Церебральная амилоидная ангиопатия (CAA) и менингеальный амилоид являются летальными заболеваниями при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Нацеливание на TTR может быть успешным с применением генетики человека и фармакологии. Целевые ткани могут представлять собой сосудистую систему ЦНС или ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть вызван тем, что мутантный белок накапливается в адвентиции сосудов, вызывая кровотечение в ЦНС. Эффективность продемонстрирована 70% KD TTR. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в CSF.

Нацеливание на ITM2B при CAA.

Мутации интегрального мембранного белка 2B вызывают церебральную амилоидную ангиопатию (CAA) британского типа или семейную британскую деменцию (FBD). Специфическая мутация также может вызывать доминантную дегенерацию сетчатки. Это заболевание является летальным нарушением при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Это редкое заболевание. Нацеливание на ITM2B может быть успешным с применением молекулярной генетики человека. Целевые ткани могут представлять собой сосудистую систему ЦНС или ЦНС. Механизм этого нацеливания, вероятно, включает мутации GOF. Эффективность продемонстрирована 70% KD мутантных аллелей ITM2B. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, возможно mRNA и белки в CSF.

Нацеливание на CST3 при CAA.

Мутации цистатина С вызывают семейную церебральную амилоидную ангиопатию исландского типа. Это заболевание является летальным нарушением при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Это редкое заболевание, за исключением Исландии и Дании. Нацеливание на CST3 может быть успешным с применением генетики человека. Целевая ткань может представлять собой сосудистую систему ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть вызван тем, что мутантный белок накапливается в адвентиции сосудов, вызывая кровотечение в ЦНС. Эффективность продемонстрирована возможными 70% KD мутантного аллеля. Что касается безопасности, мыши с KO CST3 могут иметь риск артрита. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, возможно mRNA и белки в CSF.

Нацеливание на SPAST при спастической параплегии

Мутации SPASTIN вызывают спастическую параплегию (SP) 4 с потерей когнитивной функции. Это заболевание является нейродегенеративным нарушением нижних мотонейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность SP составляет 5 случаев на 100000 населения; SP4 составляет 45% от доминантной SP. Нацеливание на SPAST может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, тринуклеотидные мутации SPAST вызывают случаи семейной SP в тканях, таких как спинной мозг или ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что бессмысловые и вероятные доминантно-отрицательные мутации вызывают аномальный метаболизм микротрубочек и нейродегенерацию. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, возможно mRNA SPAST и белки в CSF.

Нацеливание на KIF5A при спастической параплегии.

Мутации представителя 5A семейства кинезинов вызывают спастическую параплегию (SP) 10 с периферической нейропатией и другими нарушениями. Это заболевание является нейродегенеративным нарушением нижних мотонейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространен-

ность SP составляет 5 на 100000 человек; SP10 составляет 1 на 1000000 человек. Нацеливание на KIF5A может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, миссенс-мутации на аминоконце KIF5A вызывают SP10; а KIF5A экспрессируется в ЦНС и кодирует моторный белок микротрубочек. Целевой тканью может быть спинной мозг. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутомно-доминантные миссенс-мутации вызывают SP10, возможно, влияют на связывание микротрубочек. Эффективность может быть обеспечена возможным KD мутантных аллелей. Что касается безопасности, то мутации KIF5A со сдвигом рамки считывания вызывают у новорожденных трудноизлечимый миоклонус, а мутации сайтов сплайсинга связаны с семейным ALS, возможно, посредством механизмов LOF. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, возможно mRNA и белки в CSF.

Нацеливание на ATLL1 при спастической параплегии.

Мутации атластина вызывают спастическую параплегию 3A и сенсорную нейропатию 1D, наследственную сенсорную нейропатию (HSN). Это заболевание является нейродегенеративным нарушением нижних мотонейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность SP составляет 5 на 100000 человек; SP3A представляет собой редкую доминантную форму. Нацеливание на ATLL1 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации ATLL1 вызывают случаи семейной SP. Целевой тканью может быть спинной мозг. Механизм этого нацеливания может быть вызван тем, что аутомно-доминантная экспрессия доминантно-отрицательного белка ATLL1 вызывает SP3A; однако мутации LOF вызывают сенсорную нейропатию 1D. Эффективность продемонстрирована 70% KD специфического аллеля ATLL1. Что касается безопасности, гетерозиготные мутации LOF ATLL1 вызывают HSN1D. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA ATLL1 и белки в CSF.

Нацеливание на NIPA1 при спастической параплегии.

Мутации NIPA1 LOF вызывают спастическую параплегию 6 с эпилепсией и судорогами. Это заболевание является нейродегенеративным нарушением нижних мотонейронов при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность SP составляет 5 на 100000 человек; SP6 представляет собой редкую доминантную форму. Нацеливание на NIPA1 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, точечные мутации NIPA1 вызывают случаи семейной SP. Целевыми тканями может быть спинной мозг или ЦНС. Механизм этого нацеливания может заключаться в том, что аутомно-доминантная экспрессия дефектного мембранного белка вызывает SP3A и, возможно, LOF. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, возможно mRNA и белки в CSF.

Доминантно наследуемая миотоническая дистрофия представляет собой заболевание ЦНС, скелетных мышц и сердечной мышцы, требующее терапии центральной нервной системы и системной терапии. Мишени предусматривают MPK при DM1.

Нацеливание на DMPK при миотонической дистрофии 1.

Терапия ЦНС и системная терапия необходимы для эффективной терапии, направленной против миотонической дистрофии, связанной с протеинкиназой. Миотоническая дистрофия 1 (DM1) представляет собой дегенеративное нарушение мышц и ЦНС. Это нарушение является летальным при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность DM1 составляет 1 на 8000 человек во всем мире. Нацеливание на DMPK может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, размножение DMPK CTG-повторов вызывает случаи семейной DM1. Целевыми тканями могут быть скелетные мышцы, сердечные мышцы или ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутомно-доминантный не-кодирующий повтор CTG вызывает аномальный процессинг РНК и доминантный отрицательный эффект; наступление раннее срока экстремального роста вызывает раннее начало болезни. Эффективность продемонстрирована 70% DMPK; и эффективность ASO была продемонстрирована на мышах. Безопасность была продемонстрирована на мышах с KO и KD ASO. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в крови и CSF.

Нацеливание на ZNF9 при миотонической дистрофии 2.

Мутации белка "цинковые пальцы" 9 вызывают миотоническую дистрофию 2 (DM2), дегенеративное нарушение скелетных мышц. Это нарушение является серьезным при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность DM2 составляет 1 на 8000 человек во всем мире; это наиболее распространенный вид мышечной дистрофии у взрослых. Нацеливание на ZNF9 может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, размножение CTG-повторов ZNF9 в интроне 1 вызывает случаи семейной DM2. Целевыми тканями могут быть скелетные мышцы или сердечные мышцы. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что размножение аутомно-доминантных повторов CTG в интроне 1 вызывает аномальный метаболизм РНК и доминантные отрицательные эффекты. Эффективность продемонстрирована 70% ZNF9. Был продемонстрирован безопасный KD у мышей. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или

ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в крови.

Доминантно наследуемые прионные заболевания представляют собой наследственные, спорадические и трансмиссивные нарушения PRNP. Мишени предусматривают PRNP.

Нацеливание на PRNP при миотонических прионных заболеваниях Миотонические прионные заболевания являются доминантно наследуемыми прионными заболеваниями, которые включают PRNP-связанную церебральную амилоидную ангиопатию, болезнь Герстмана-Штрауслера (GSD), болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), фатальную семейную бессонницу (FFI), заболевание, подобное болезни Хантингтона 1 типа (HDL1) и восприимчивость Куру. Эти заболевания представляют собой летальные нейродегенеративные нарушения при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность этого вида заболеваний составляет 1 на 1000000 человек. Нацеливание на PRNP может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, мутации PRNP вызывают случаи семейной и спорадической прионной болезни. Целевая ткань может представлять собой ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-доминантный фолдинг белка в средней фазе вызывает нейротоксичность. Эффективность продемонстрирована 70% KD PRNP; и полиморфизм PRNP оказывается защитным в отношении Куру. Что касается безопасности, мыши с KO PRNP были признаны здоровыми. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в CSF. Нацеливание на гликоген-синтазу при миоклонической эпилепсии Лафора Мутации гена лафорина (EPM2A) вызывают AR миоклоническую эпилепсию, наследственное прогрессирующее нарушение, сопровождающееся судорогами. Это заболевание представляет собой летальное нарушение, вызывающее судороги и снижение когнитивных функций, при отсутствии модифицирующей болезни терапии. Распространенность этого заболевания составляет 4 на 1000000 человек. Нацеливание на гликоген-синтазу может быть успешным с применением молекулярной генетики человека, например, мутации вызывают семейную миоклоническую эпилепсию AR Лафора. Целевая ткань может представлять собой ЦНС. Механизм этого нацеливания может быть связан с тем, что аутосомно-рецессивная дисфункция лафорина вызывает неправильное сворачивание гликогена и очаги судорог. Эффективность продемонстрирована 70% KD гликоген-синтазы GYS1. Что касается безопасности, то дефицит GYS1 вызывает дефицит гликогена в скелетных и сердечных мышцах; выжившие мыши с GYS1 имеют мышечные дефекты. Возможный диагноз включает семейный анамнез; генетическое тестирование или ранние симптомы. Биомаркеры, которые можно использовать, включают, например, mRNA и белки в CSF.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, нацеленное на гены, связанные с заболеваниями, в том числе без ограничения, возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD) (сухая и влажная), хориоретинопатией в виде выстрела в птицу, доминантным пигментным ретинитом 4, дистрофией Фуха, амилоидозом hATTR, наследственной и спорадической глаукомой и болезнью Старгардта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на VEGF при влажной (или экссудативной) AMD.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на C3 при сухой (или неэкссудативной) AMD.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на CFB при сухой (или неэкссудативной) AMD.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на MYOC при глаукоме.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на ROCK2 при глаукоме.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на ADRB2 при глаукоме.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на CA2 при глаукоме.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на CRYGC при катаракте.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает средство на основе двухцепочечной iRNA, которое нацеливается на PPP3CB при синдроме сухого глаза.

Лиганды.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению дополнительно модифицируется посредством ковалентного присоединения одной или нескольких конъюгатных групп. Как правило, конъюгатные группы модифицируют одно или несколько свойств присоединенного средства на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, в том числе без ограничения фармакодинамические, фармакокинетические, связывание, абсорбцию, клеточное распределение, клеточное поглощение, заряд и клиренс. Конъюгатные группы, как правило, используются в областях химии и связываются напрямую или посредством необязательного связывающего фрагмен-

та или связывающей группы с исходным соединением, таким как олигомерное соединение. Предпочтительный перечень конъюгатных групп включает без ограничения интеркаляторы, репортерные молекулы, полиамины, полиамиды, полиэтиленгликоли, тиоэфиры, простые полиэфиры, холестерин, тиохолестерин, группы хелевой кислоты, фолат, липиды, фосфолипиды, биотин, феназин, фенантридин, антрахинон, адамантан, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины и красители.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, который опосредует доставку в конкретную ткань ЦНС. Эти нацеливающие лиганды могут быть конъюгированы в комбинации с липофильным фрагментом для обеспечения специфической интраклеточной и системной доставки.

Примерные нацеливающие лиганды, которые нацелены на опосредованную рецептором доставку в ткань ЦНС, представляют собой пептидные лиганды, такие как ангиопеп-2, лиганд белка, родственного липопротеиновому рецептору (LRP), лиганд связывания клетки bEnd.3, лиганд рецептора трансферрина (TfR) (который может использовать систему транспорта железа в головном мозге и транспортировку грузов в паренхиме мозга); лиганд рецептора манозы (который нацелен на обонятельные обволакивающие клетки, глиальные клетки), белок-переносчик глюкозы и лиганд рецептора LDL.

В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, который опосредует доставку в конкретную ткань глаза. Эти нацеливающие лиганды могут быть конъюгированы в комбинации с липофильным фрагментом для обеспечения специфической интравитреальной и системной доставки. Примеры нацеливающих лигандов, которые нацелены на опосредованную рецептором доставку в ткань глаза, представляют собой липофильные лиганды, такие как весь транс-ретинол (который нацелен на рецептор ретиноевой кислоты); пептид RGD (который нацелен на пигментные эпителиальные клетки сетчатки), например N-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-Cys-OH или цикло(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys; лиганды рецептора LDL и лиганды на основе углеводов (которые нацелены на эндотелиальные клетки заднего отдела глаза).

Предпочтительные конъюгатные группы, подходящие для настоящего изобретения, включают липидные фрагменты, такие как фрагмент холестерина (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553); хелевая кислота (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053), тиоэфир, например гексил-F-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), алифатическая цепь, например додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49), фосфолипид, например ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777), полиаминовая или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969), или адамантануксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229) или октадециламинный или гексиламинокарбонилхолестериновый фрагмент (Cooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923).

Как правило, с олигомерными соединениями, описанными в данном документе, может быть связано большое количество различных объектов, например лигандов. Лиганды могут включать встречающиеся в природе молекулы или рекомбинантные или синтетические молекулы. Примеры лигандов включают без ограничения полилизин (PLL), поли-Е-аспарагиновую кислоту, поли-Е-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида, сопряженного с гликолем), сополимер дивинилового эфира и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG, например, PEG-2К, PEG-5К, PEG-10К, PEG-12К, PEG-15К, PEG-20К, PEG-40К), MPEG, [MPEG]2, поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловая кислота), полимеры N-изопропилакриламида, полифосфазин, полиэтиленмин, катионные группы, спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидопептид-полиамин, пептидомиметик дендример полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфилин, четвертичная соль полиамина, тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, муцин, гликозилированные полиаминокислоты, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, аптамер, асиалофетуин, гиалуронан, проколлаген, иммуноглобулины (например, антитела), инсулин, трансферрин, альбумин, конъюгаты сахар-альбумин, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (например, TRPC4, тексафин, сапфин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы (например, стероиды, желчные кислоты, холестерин, хелевая кислота, адамантануксусная кислота, 1-пиренмасляная кислота, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексильная группа, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильная группа, пальмитиновая кислота, миристиновая кислота, О3-(олеоил)литохолевая кислота, О3-(олеоил)холеновая кислота, диметокситрил или феноксазин), пептиды (например, альфа-спиральный пептид, амфипатический пептид, пептид RGD, пептид, обеспечивающий клеточное проникновение, эндосомолитический/фузогенный пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминок, меркапто, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоак-

тивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), ускорители транспорта/абсорбции (например, напроксен, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты, комплексы Eu^{3+} тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP, AP, антитела, гормоны и рецепторы гормонов, лектины, углеводы, поливалентные углеводы, витамины (например, витамин А, витамин Е, витамин К, витамин В, например фолиевая кислота, В12, рибофлавин, биотин и пиридоксаль), кофакторы витаминов, липополисахарид, активатор киназы р38 MAP, активатор NF-кВ, таксон, винкрисгин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданолон, миосервин, фактор некроза опухоли альфа (TNFalpha), интерлейкин-1 бета, гамма-интерферон, природный или рекомбинантный липопротеин низкой плотности (LDL), природный или рекомбинантный липопротеин высокой плотности (HDL) и средство, обеспечивающее проникновение в клетку (например, средство на основе спирали, обеспечивающее проникновение в клетку).

Пептидные лиганды и лиганды-пептидомиметики включают лиганды, имеющие встречающиеся в природе или модифицированные пептиды, например D- или L-пептиды; α -, β - или γ -пептиды; N-метилпептиды; азапептиды; пептиды, у которых одна или несколько амидных, т.е. пептидных, связей замещены одной или несколькими мочевиными, тиомочевинными, карбаматными или сульфонилмочевинными связями; или циклические пептиды. Пептидомиметик (также обозначаемый в данном документе как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную к укладке в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Длина пептидного лиганда или лиганда-пептидомиметика может составлять в длину приблизительно 5-50 аминокислот, например приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Иллюстративные амфипатические пептиды включают без ограничений цекропины, ликотоксины, парадоксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плевроцидины, пептиды H_2A , пептиды Xenopus, эскулентины-1 и церины.

Как используется в данном документе термин "эндосомолитический лиганд" относится к молекулам, характеризующимся эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису и/или транспортировке композиции по настоящему изобретению или ее компонентов из клеточных компартментов, таких как эндосома, лизосома, эндоплазматический ретикулум (ER), аппарат Гольджи, микротрубочки, пероксисомы или другие везикулярные тела внутри клетки, к цитоплазме клетки. Некоторые иллюстративные эндосомолитические лиганды включают без ограничения имидазолы, поли- или олигоимидазолы, линейные или разветвленные полиэтиленимины (PEI), линейные и разветвленные полиамины, например спермин, катионные линейные и разветвленные полиамины, поликарбоксилаты, поликатионы, маскированные олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфир, линейные или разветвленные полимеры с маскированными или немаскированными катионными или анионными зарядами, дендримеры с маскированными или немаскированными катионными или анионными зарядами, полианионные пептиды, полианионные пептидомиметики, pH-чувствительные пептиды, природные и синтетические фузогенные липиды, природные и синтетические катионные липиды.

Примеры эндосомолитических/фузогенных пептидов включают без ограничения AALEALAE-ALEALAEALEALAEAAAAGGC (GALA); AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC (EALA); ALEALAEALEALAEA; GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG (INF-7); GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG (Inf HA-2); GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGCGLFEAIEGFIENGWEGMID GWYGC (diINF-7); GLFEAIEGFIENGWEGMIDGGCGLFEAIEGFIENGWEGMIDGGC (diINF-3); GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAGGSC (GLF); GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAAGGSC (GALA-INF3); GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG (INF-5, n представляет собой норлейцин); LFEALLELLESLWELLLEA (JTS-1); GLFKALLKLLKSLWKLKLLKA (ppTG1); GLF-RALLRLLRSLWRLLLR (ppTG20); WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (KALA); GLFFEAI AEFIEGGWEGLEGC (HA); GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ (меллитин); H_5WYG ; а также CHK_6HC .

Не желая быть связанными теорией, фузогенные липиды сливаются с мембраной и, следовательно, дестабилизируют ее. Фузогенные липиды, как правило, имеют небольшие группы "головки" и ненасыщенные ацильные цепи. Примеры фузогенных липидов включают без ограничения 1,2-дидеоил-sn-3-фосфоэтаноламин (DOPE), фосфатидилэтаноламин (POPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ол (Di-Lin), N-метил(2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)-1,3-диоксолан-4-ил)метанамин (DLin-k-DMA) и N-метил-2-(2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)-1,3-диоксолан-4-ил)этаноламин (также обозначаемый в данном документе как ХТС).

Синтетические полимеры с эндосомолитической активностью, подходящие для настоящего изобретения, описаны в публикациях заявок на патент США №№ 2009/0048410; 2009/0023890; 2008/0287630; 2008/0287628; 2008/0281044; 2008/0281041; 2008/0269450; 2007/0105804; 20070036865 и 2004/0198687, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Примеры пептидов, обеспечивающих проникновение в клетку, включают без ограничения RQIKI-WFQRRMKWKK (пенетратин); RKGKRRQRRRPPQC (Tat-фрагмент 48-60); GALFLGWL-GAAGSTMGAWSQPCKKRKV (пептид на основе сигнальной последовательности); LLILRRRIRKQAHANSK (PVEC); GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL (транспортан); KLALKLALKALKAAALKA (амфифильный модельный пептид); RRRRRRRR (Arg9); KFFKFFKFFK (пептид, обеспечивающий проникновение через стенку бактериальной клетки); LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES (LL-37); SWLSKTAKKLENSAKKRISSEIAIAIQGGPR (цекропин P1); ACYCRIPACIAGERRYGTCI-YQGRLWAFCC (α -дефензин); DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK (β -дефензин); RRRRPPYLPRRPPPPFFPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPGKR-NH₂ (PR-39); ILPWKWPWWPWR-NH₂ (индолицидин); AAVALLPAVLLALLAP (RFGF); AALLPVLLAAP (аналог RFGF); а также RKCRIVVIRVCR (бактенецин).

Примеры катионных групп включают без ограничения протонированные аминогруппы, полученные, например, из О-АМИН (АМИН=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); аминоалкокси, например O(CH₂)_n АМИН, (например, АМИН=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино); амино (например, NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислота) и NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-АМИН (АМИН=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино).

Как используется в данном документе термин "нацеливающий лиганд" относится к любой молекуле, которая обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например к клетке, типу клетки, ткани, органу, участку тела или компартменту, например клеточному, тканевому или органному компартменту. Некоторые иллюстративные нацеливающие лиганды включают без ограничения антитела, антигены, фолаты, лиганды рецепторов, углеводы, аптамеры, лиганды рецепторов интегрина, лиганды рецепторов хемокина, трансферрин, биотин, лиганды рецепторов серотонина, PSMA, эндотелии, GCP II, соматостатин и лиганды LDL и HDL.

Нацеливающие лиганды на основе углеводов включают без ограничения D-галактозу, поливалентную галактозу, N-ацетил-О-галактозамин (GalNAc), поливалентный GalNAc, например GalNAc₂ и GalNAc₃ (GalNAc и поливалентный GalNAc совместно именуется в данном документе конъюгатами GalNAc); D-маннозу, поливалентную маннозу, поливалентную лактозу, N-ацетил-глюкозамин, глюкозу, поливалентную глюкозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты и лектины. Термин "поливалентный" указывает на наличие более одной моносакхаридной единицы. Такие моносакхаридные субъединицы могут быть связаны друг с другом посредством гликозидных связей или связаны с молекулой остова.

Ряд фолатов и аналогов фолата, подходящих для настоящего изобретения в качестве лигандов, описан в патентах США №№ 2816110; 5552545; 6335434 и 7128893, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Используемые в данном документе термины "лиганд, модулирующий РК" и "модулятор РК" относятся к молекулам, которые могут модулировать фармакокинетику композиции по настоящему изобретению. Некоторые иллюстративные модуляторы РК включают без ограничения липофильные молекулы, желчные кислоты, стерины, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие средства, витамины, жирные кислоты, феноксазин, аспирин, напроксен, ибупрофен, супрофен, кетопрофен, (S)-(+)-пранопрофен, карпрофен, PEG, биотин и транстиретиа-связывающие лиганды (например, тетраидтироуксусная кислота, 2,4,6-трийодфенол и флуфенамовая кислота). Известно также, что олигомерные соединения, которые содержат ряд фосфотиоатных межсахарных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигомерные соединения, например олигонуклеотиды, содержащие от приблизительно 5 до 30 нуклеотидов (например, от 5 до 25 нуклеотидов, предпочтительно от 5 до 20 нуклеотидов, например 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов) и которые содержат множество фосфотиоатных связей в остове, также применимы для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве лигандов, модулирующих РК). Олигонуклеотид, модулирующий РК, может содержать по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более фосфотиоатных и/или фосфодитиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления все межнуклеотидные связи в олигонуклеотиде, модулирующем РК, являются фосфотиоатными и/или фосфодитиоатными связями. Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками) также пригодны в настоящем изобретении в качестве РК-модулирующих лигандов. Связывание с компонентами сыворотки крови (например, с сывороточными белками) можно предсказать с помощью анализов связывания альбумина, таких как те, что описаны в Oravcova, et al., *Journal of Chromatography B* (1996), 677: 1-27.

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

модулирующими свойствами. В предпочтительном варианте осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганд или связанный лиганд может присутствовать на мономере, когда указанный мономер включен в компонент средства на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению (например, средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению или линкер). В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть включен посредством связывания с мономером "предшественником" после того, как указанный мономер "предшественник" был включен в компонент средства на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению (например, средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению или линкер). Например, мономер, содержащий например связывающий фрагмент с аминогруппой на конце (т.е. без ассоциированного лиганда), например мономер-линкер-NH₂, может быть включен в компонент соединений по настоящему изобретению (например, средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению или линкер). На следующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в компонент соединений по настоящему изобретению (например, средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению или линкер), лиганд с электрофильной группой, например, группой сложного пентафторфенилэфира или альдегидной группой, затем можно прикрепить к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

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

В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеиновыми основаниями, сахарными фрагментами или межнуклеозидными связями в средстве на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению. Конъюгация с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может происходить в любом положении, в том числе по атомам внутри кольца и вне кольца. В некоторых вариантах осуществления к 2-, 6-, 7- или 8-положениям пуринового нуклеинового основания присоединен конъюгатный фрагмент. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть замещены конъюгатным фрагментом. Когда лиганд конъюгирован с нуклеиновым основанием, предпочтительным положением является положение, которое не мешает гибридизации, т.е. не мешает взаимодействиям водородных связей, необходимых для спаривания оснований.

Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода в сахарном фрагменте, к которым может быть присоединен конъюгатный фрагмент, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. К 1'-положению также может быть присоединен конъюгатный фрагмент, как, например, к остатку с удаленным азотистым основанием. Межнуклеозидные связи также могут нести конъюгатные фрагменты. Что касается фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.), то конъюгатный фрагмент может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, PNA), конъюгатный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

Существует множество способов получения конъюгатов олигонуклеотидов. Как правило, олигонуклеотид присоединяется к конъюгатному фрагменту путем приведения в контакт реакционноспособной группы (например, OH, SH, амина, карбоксила, альдегида и т.п.) на олигонуклеотиде с реакционноспособной группой на конъюгатном фрагменте. В некоторых вариантах осуществления одна реакционноспособная группа является электрофильной, а другая представляет собой нуклеофильную.

Например, электрофильная группа может представлять собой карбонилсодержащую функциональную группу, а нуклеофильная группа может представлять собой амин или тиол. Способы конъюгации нуклеиновых кислот и родственных олигомерных соединений со связывающими группами и без них хорошо описаны в литературе, такой как, например, Manoharan in *Antisense Research and Applications*, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

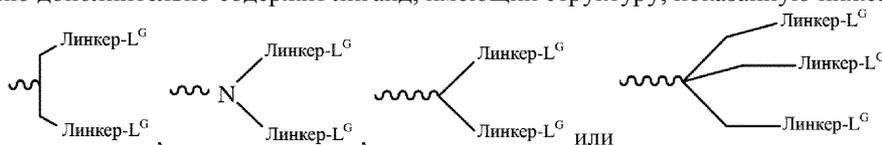
Лиганд может быть присоединен к средству на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению посредством линкера или мономера-носителя, например лиганда-носителя. Носители включают: (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Выражение "точка присоединения к остову", как используется в данном документе, относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или в целом к связи, предусмотренной для введения мономера-носителя в остов и которая подходит для этого, например к фосфату или модифицированному фосфату, например,

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

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение конъюгатов нуклеиновых кислот, включают без ограничения патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5580731; 5591584; 5109124; 5118 802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5149782; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5672662; 5688941; 5714166; 6153737; 6172208; 6300319; 6335434; 6335437; 6395437; 6444806; 6486308; 6525031; 6528631; 6559279; содержание которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

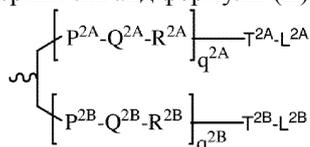
В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой лиганд на основе углеводов. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит лиганд, имеющий структуру, показанную ниже:

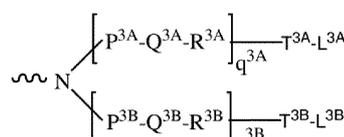


где L^G независимо в каждом случае представляет собой лиганд, например углевод, например моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид; а также каждый из Z' , Z'' , Z''' и Z'''' независимо в каждом случае представляет собой O или S.

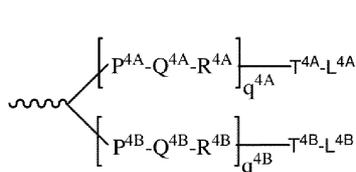
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд формулы (II), (III), (IV) или (V):



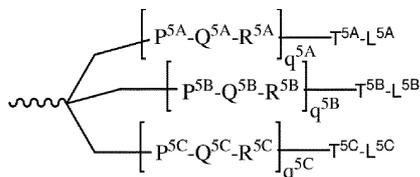
Формула (II)



Формула (III)



Формула (IV)



Формула (V)

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

Q и Q' независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой $-(P^7-Q^7-R^7)_p-T^7-$ или $-T^7-Q^7-T^7-B-T^8-Q^8-T^8-$;

каждый из P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , P^7 , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{4A} , T^{5B} , T^{5C} , T^7 , T^7 , T^8 и T^8 независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

В представляет собой $-CH_2-N(B^L)-CH_2-$;

B^L представляет собой $-T^B-Q^B-T^B-R^x-$;

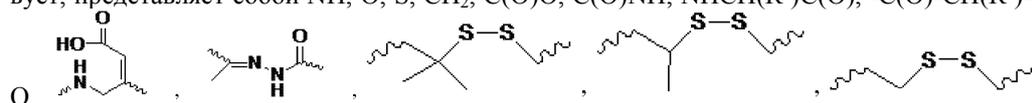
Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} , Q^7 , Q^8 и Q^B независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, и где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый из T^B и T^B независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S,

OC(O), OC(O)O, NHC(O), NHC(O)NH, NHC(O)O, CH₂, CH₂NH или CH₂O;

R^x представляет собой липофил (например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин), витамин (например, фолат, витамин А, витамин Е, биотин, пиридоксаль), пептид, углевод (например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид, полисахарид), эндосомолитический компонент, стероид (например, уваол, гецигенин, диосгенин), терпен (например, тритерпен, например сарсасапоген, например сарсасапогенин, Friedelin, литохолевая кислота, полученная посредством эпифриделанола) или катионный липид;

каждый из R¹, R², R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}, R⁷ независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-

O,  или гетероцик-
лил;

каждый из L¹, L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} и L^{5C} независимо в каждом случае представляет собой углеводород, например моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид;

каждый из R¹ и R² независимо представляет собой H, C₁-C₆-алкил, OH, SH или N(R^N)₂;

R^N независимо в каждом случае представляет собой H, метил, этил, пропил, изопропил, бутил или бензил;

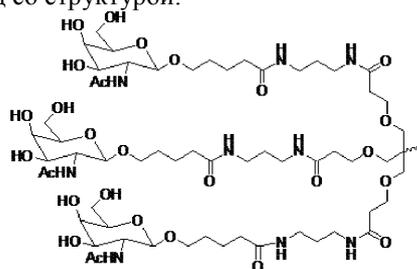
R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты;

каждый из Z¹, Z², Z³ и Z⁴ независимо в каждом случае представляет собой O или S;

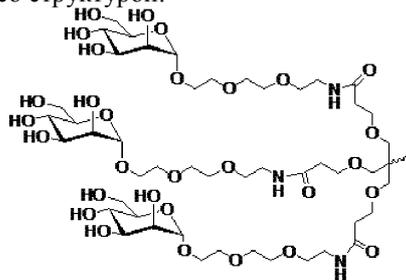
r независимо составляет в каждом случае 0-20.

Как обсуждалось выше, поскольку лиганд может быть конъюгирован со средством на основе iRNA посредством линкера или носителя, и поскольку линкер или носитель могут содержать разветвленный линкер, средство на основе iRNA может затем содержать несколько лигандов посредством тех же или отличных точек присоединения остова к носителю или посредством разветвленного(ых) линкера(ов). Например, точка разветвления разветвленного линкера может быть двухвалентным, трехвалентным, четырехвалентным, пятивалентным или шестивалентным атомом или группой, представляющей такие множественные валентности. В определенных вариантах осуществления точка разветвления представляет собой -N-, -N(Q)-C-, -O-C-, -S-C-, -SS-C-, -C(O)N(Q)-C-, -OC(O)N(Q)-C-, -N(Q)C(O)-C или -N(Q)C(O)O-C; где Q независимо представляет собой в каждом отдельном случае H или необязательно замещенный алкил. В другом варианте осуществления точка разветвления представляет собой глицерин или производное глицерина.

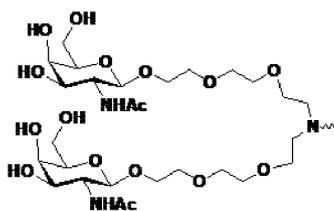
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



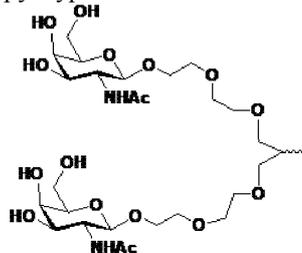
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



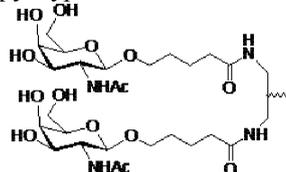
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



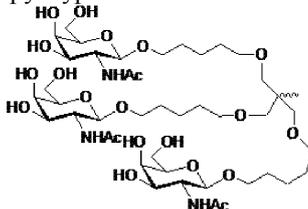
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



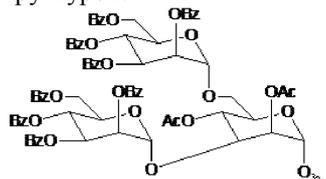
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



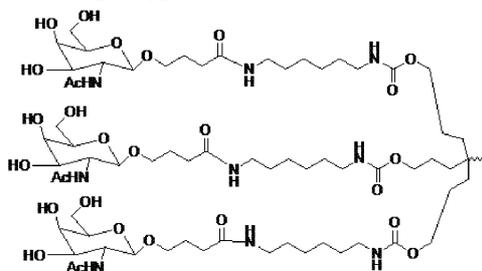
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



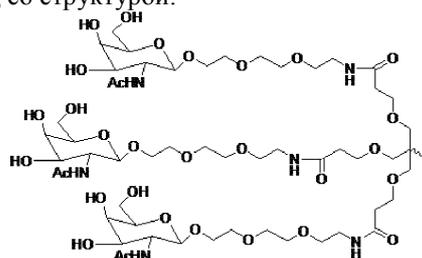
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



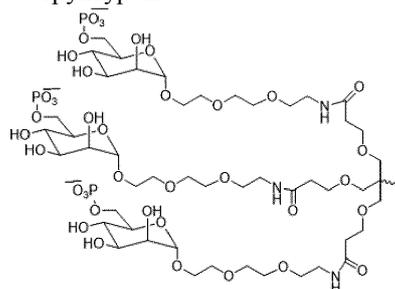
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



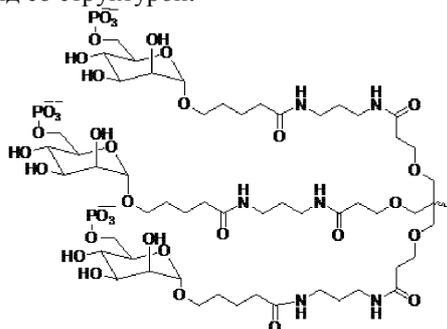
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



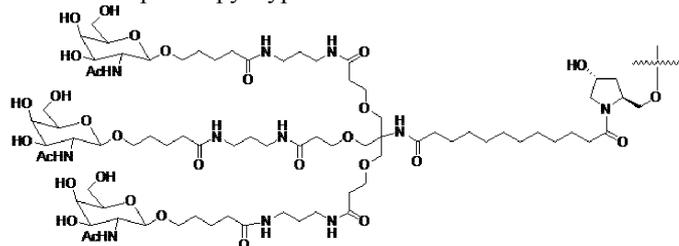
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



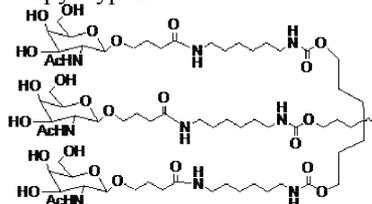
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:

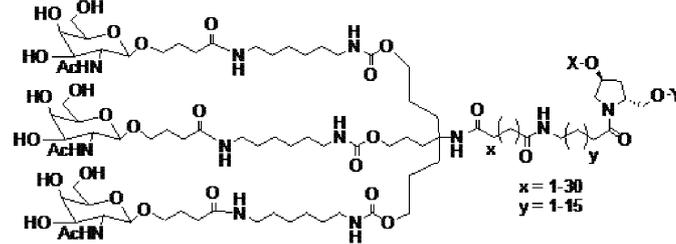


В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:

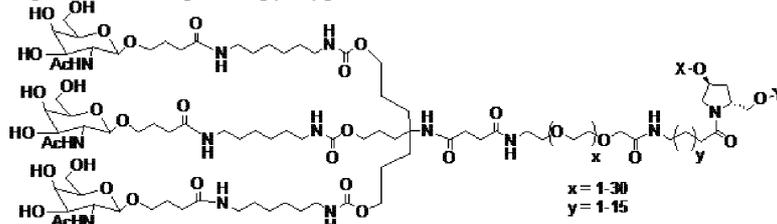


Иллюстративные мономеры лигандов.

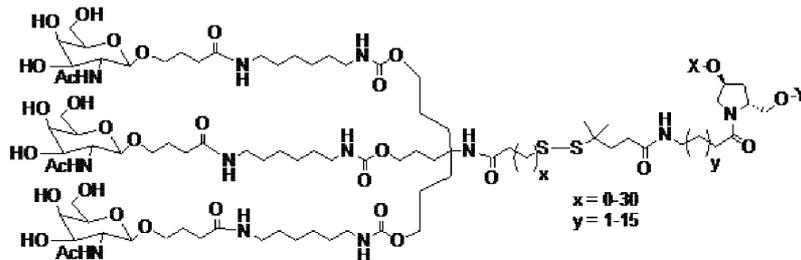
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



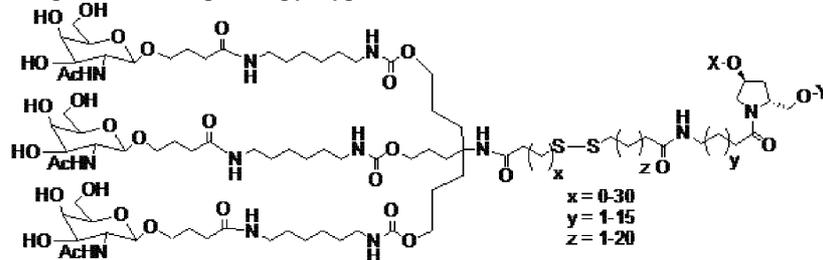
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



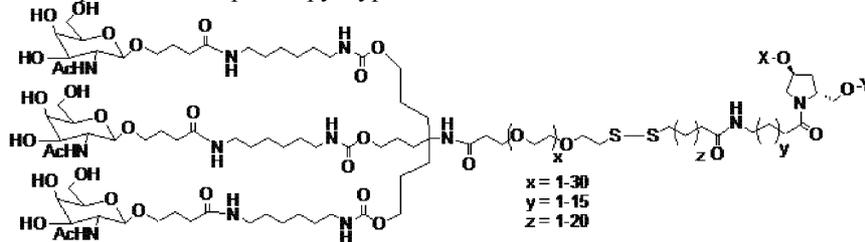
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



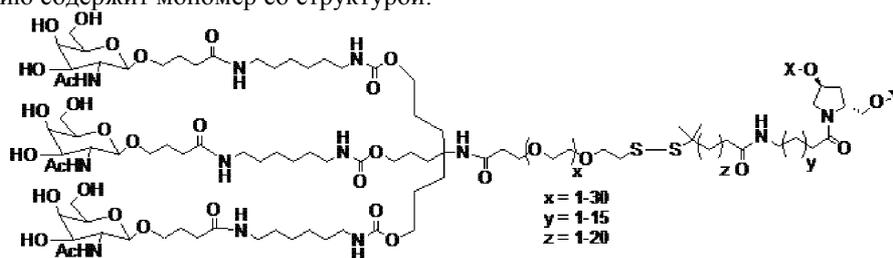
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



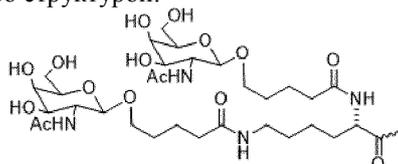
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



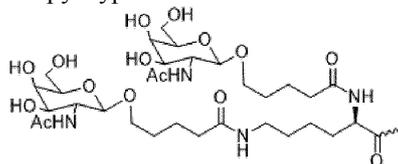
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



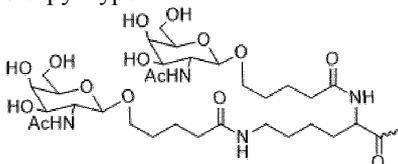
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



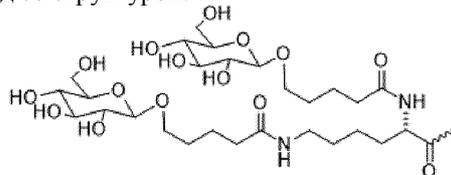
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



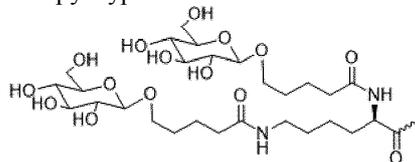
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



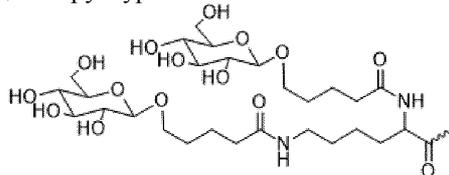
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



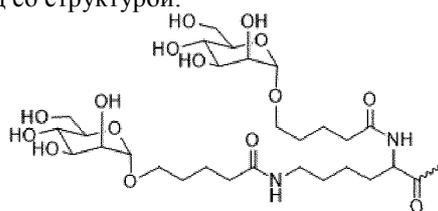
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



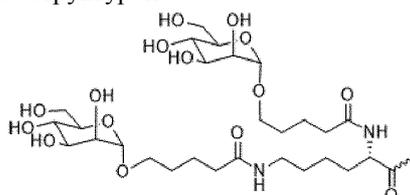
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



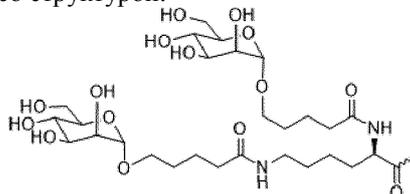
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



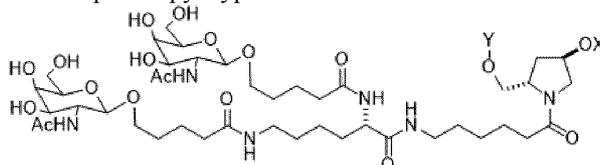
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



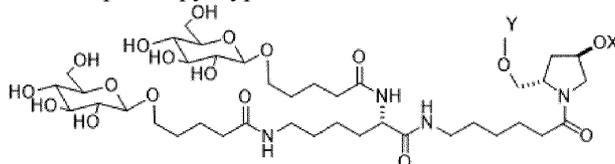
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



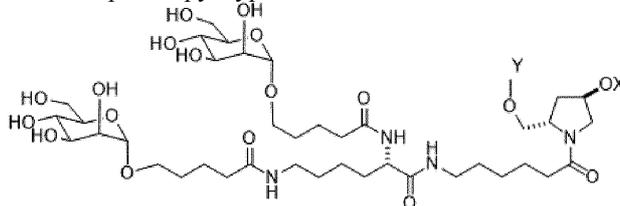
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



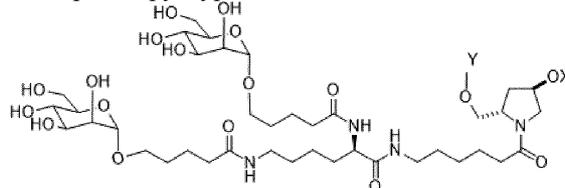
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



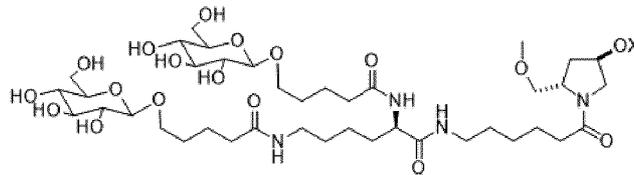
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



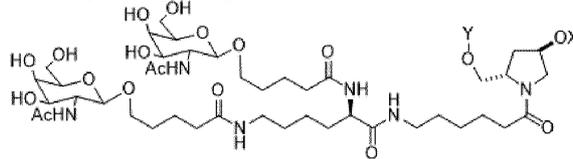
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



В некоторых вариантах осуществления L^{2A} и L^{2B} отличаются.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления L^{3A} и L^{3B} одинаковы.

В некоторых вариантах осуществления L^{3A} и L^{3B} отличаются.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления L^{4A} и L^{4B} одинаковы.

В некоторых вариантах осуществления L^{4A} и L^{4B} отличаются.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления все из L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} одинаковы.

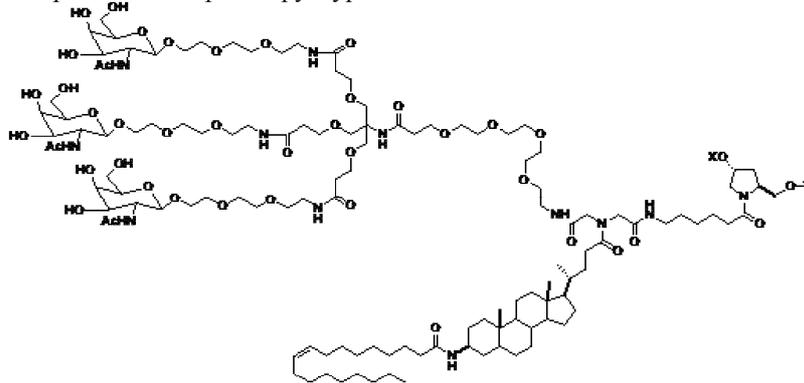
В некоторых вариантах осуществления два из L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} одинаковы.

В некоторых вариантах осуществления L^{5A} и L^{5B} одинаковы.

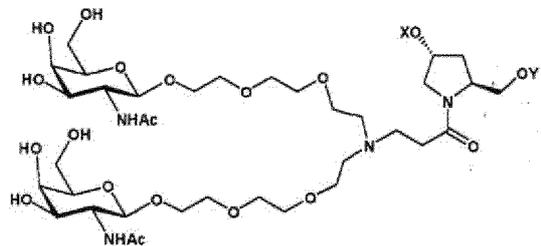
В некоторых вариантах осуществления L^{5A} и L^{5C} одинаковы.

В некоторых вариантах осуществления L^{5B} и L^{5C} одинаковы.

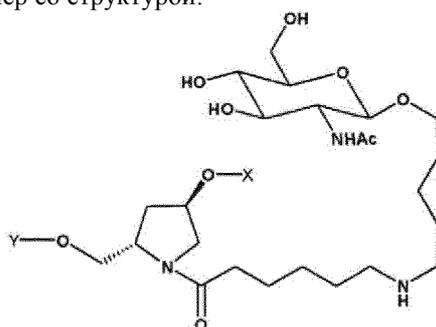
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



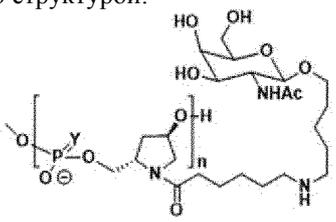
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:

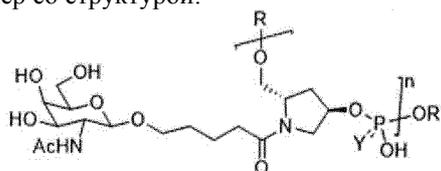


В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



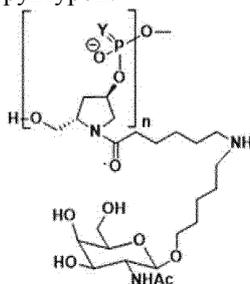
где Y представляет собой O или S, а n составляет 1-6.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



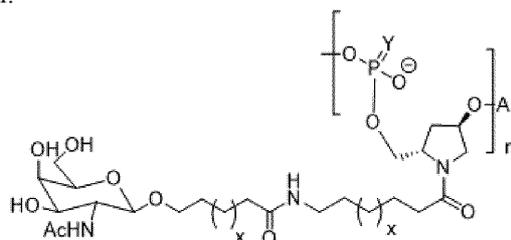
где Y представляет собой O и S, n составляет 1-6, R представляет собой водород или нуклеиновую кислоту, и R' представляет собой нуклеиновую кислоту.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



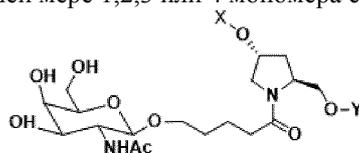
где Y представляет собой O или S, а n составляет 1-6.

В определенных вариантах осуществления олигомерное соединение, описанное в данном документе, в том числе без ограничения средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, содержит мономер структуры:

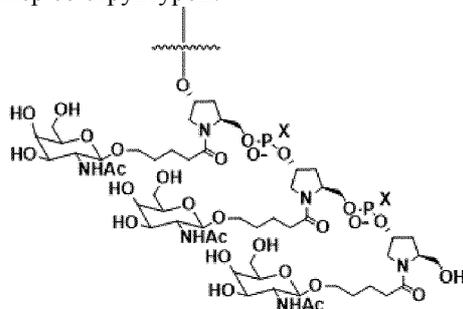


где Y представляет собой O или S, n составляет 2-6, x составляет 1-6, и A представляет собой H или фосфатную связь.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере 1,2,3 или 4 мономера со структурой:

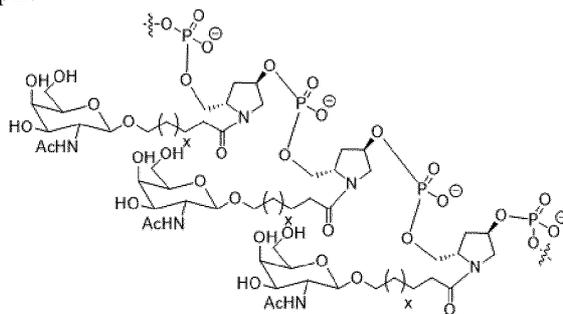


В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



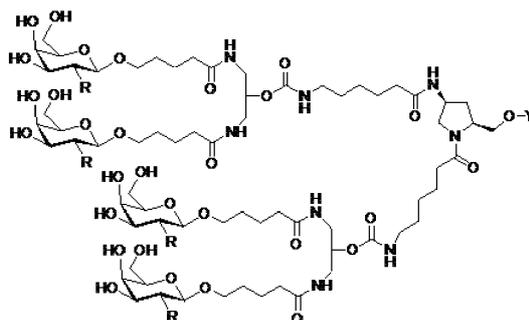
где X представляет собой O или S.

В определенных вариантах осуществления олигомерное соединение, описанное в данном документе, в том числе без ограничения средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению, содержит мономер структуры:



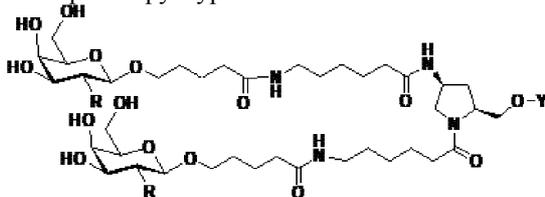
где x составляет 1-12.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



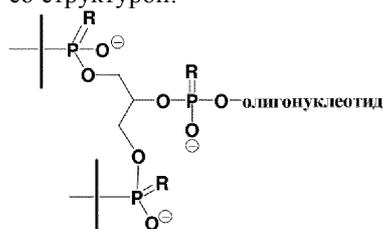
где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

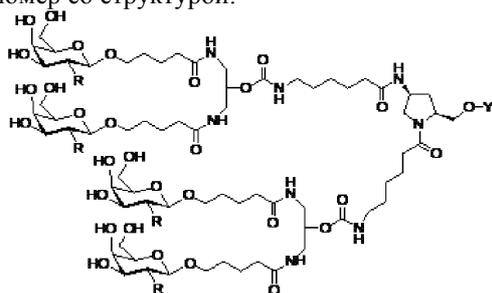
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



Формула (VII)

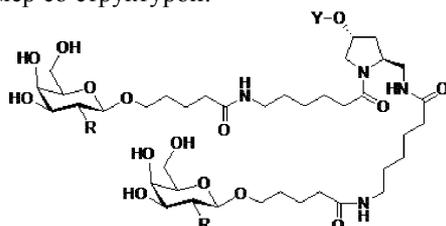
где R представляет собой O или S.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:

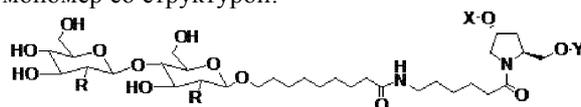


где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:

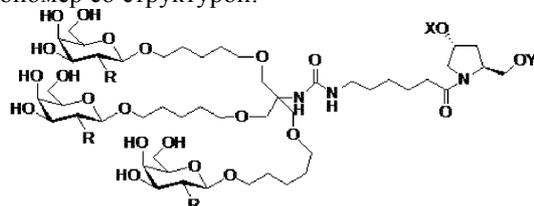


В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



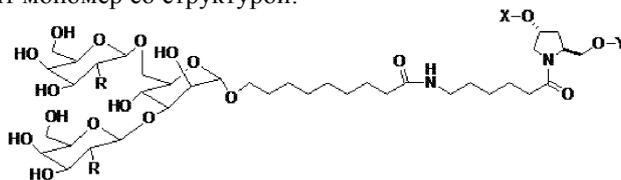
где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



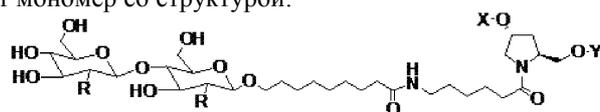
где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



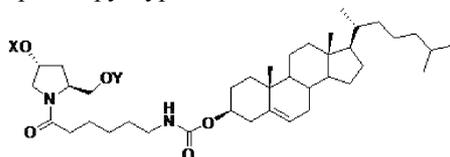
где R представляет собой OH или NHCOCH₃.

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



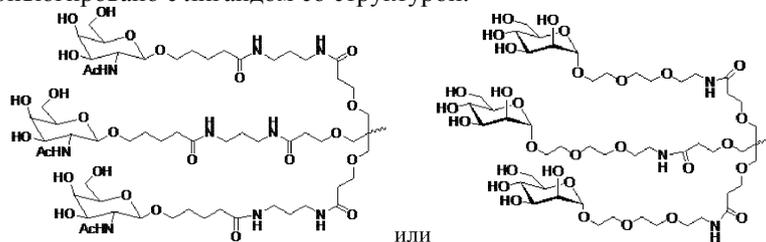
где R представляет собой OH или NHCOCH_3 .

В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:

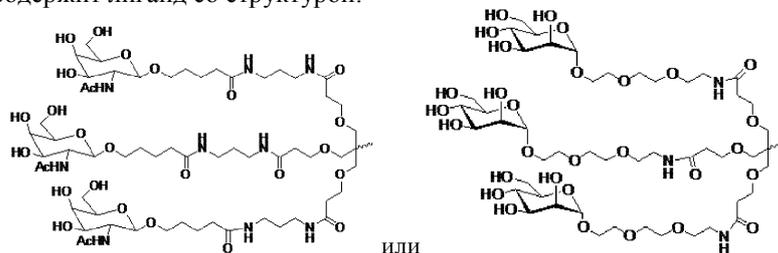


В описанных выше мономерах каждый из X и Y независимо в каждом случае представляет собой H, защитную группу, фосфатную группу, фосфодиэфирную группу, активированную фосфатную группу, активированную фосфитную группу, фосфорамидит, твердый носитель, $-\text{P}(\text{Z}')(\text{Z}'')\text{O}$ -нуклеозид, $-\text{P}(\text{Z}')(\text{Z}'')\text{O}$ -олигонуклеотид, липид, PEG, стероид, полимер, нуклеотид, нуклеозид или олигонуклеотид; и каждый из Z' и Z'' независимо представляют собой O или S.

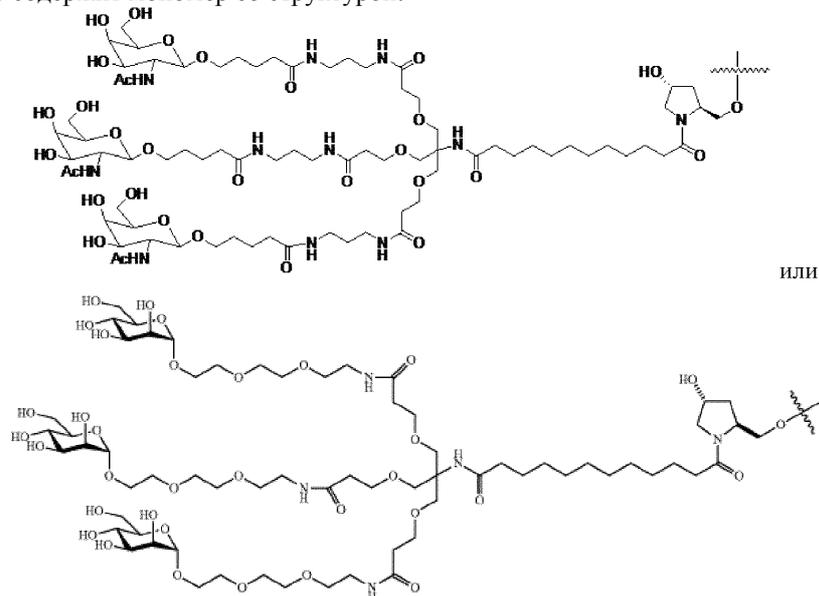
В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению конъюгировано с лигандом со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит лиганд со структурой:



В определенных вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению содержит мономер со структурой:



Синтез описанных выше лигандов и мономеров описан, например, в патенте США № 8106022, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

Оценка кандидатных iRNA.

Можно оценить кандидатное средство на основе iRNA, например модифицированную РНК, по выbranному свойству, подвергая средство или модифицированную молекулу и контрольную молекулу подходящим условиям и оценивая наличие выбранного свойства. Например, устойчивость к разлагающему средству можно оценить следующим образом. Кандидатную модифицированную РНК (и контрольную молекулу, обычно в немодифицированной форме) можно подвергать воздействию разлагающих условий, например воздействию среды, которая включает средство для разложения, например нуклеазу. Например, можно использовать биологический образец, например, такой, который подобен окружению, которое может встречаться при терапевтическом применении, например, кровь или клеточная фракция, например бесклеточный гомогенат или разрушенные клетки. Затем кандидатный и контрольный образцы могут быть оценены в отношении устойчивости к разложению любым из ряда подходов. Например, кандидатный и контрольный образцы могут подвергаться мечению перед воздействием, посредством, например, радиоактивной или ферментативной метки или флуоресцентной метки, например, Су3 или Су5. Контрольные и модифицированные РНК можно инкубировать со средством для разложения и, необязательно, с контрольным, например инактивированным, например инактивированным нагреванием, средством для разложения. Затем определяют физический параметр, например размер, модифицированной и контрольной молекул. Данное определение можно провести посредством физического способа, например электрофореза в полиакриламидном геле или колонки с распределением по размеру, для оценки того, сохранила ли молекула свою первоначальную длину, или функциональной оценки. В качестве альтернативы, для определения длины немеченой модифицированной молекулы можно использовать нозерн-блоттинг.

Для оценки кандидатного средства можно также применять функциональный анализ. Функциональный анализ можно применять первоначально или после предыдущего нефункционального анализа (например, анализа устойчивости к разложению), чтобы определить, изменяет ли модификация способность молекулы обеспечивать сайленсинг экспрессии гена. Например, клетка, например клетка млекопитающего, например клетка мышцы или человека, может быть котрансфицирована плазмидой, экспрессирующей флуоресцентный белок, например GFP, и кандидатным средством на основе РНК, гомологичным транскрипту, кодирующему флуоресцентный белок (см., например, WO 00/44914). Например, модифицированная dsRNA, гомологичная mRNA GFP, может быть проанализирована в отношении способности подавлять экспрессию GFP путем мониторинга снижения флуоресценции клетки по сравнению с контрольной клеткой, в которой трансфекция не включала кандидатную dsRNA, например, контроли без добавленного средства и/или контроли с добавленной немодифицированной РНК. Эффективность кандидатного средства в отношении экспрессии генов можно оценить путем сравнения флуоресценции клеток в присутствии модифицированных и немодифицированных соединений на основе dssiRNA.

В альтернативном функциональном анализе кандидатное соединение на основе dssiRNA, гомологичное эндогенному гену мышцы, например, гену, экспрессируемому по материнской линии, например, c-mos, можно вводить в незрелый ооцит мышцы для оценки способности средства подавлять экспрессию гена *in vivo* (см., например, WO 01/36646). Фенотип ооцита, например способность поддерживать остановку в метафазе II, можно отслеживать как индикатор того, что средство подавляет экспрессию. Например, расщепление mRNA c-mos соединением dssiRNA может обеспечить выход ооцита из остановки метафазы и иницировать партеногенетическое развитие (Colledge et al. Nature 370: 65-68, 1994; Hashimoto et al. Nature, 370:68-71, 1994). Влияние модифицированного средства на уровни целевой РНК можно проверить с помощью нозерн-блоттинга для анализа на снижение уровня целевой mRNA или вестерн-блоттинга для анализа на снижение уровня целевого белка по сравнению с отрицательным контролем. Контроли могут включать клетки, в которые не добавлено средство, и/или клетки, в которые добавлена немодифицированная РНК.

Физиологические эффекты.

Описанные в данном документе соединения на основе siRNA могут быть сконструированы таким образом, чтобы определение терапевтической токсичности облегчалось за счет комплементарности siRNA как с последовательностью человека, так и с последовательностью животного, отличного от человека. С помощью этих способов siRNA может состоять из последовательности, которая полностью комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты человека и последовательности нуклеиновой кислоты по меньшей мере одного животного, отличного от человека, например, млекопитающего, отличного от человека, такого как грызун, жвачное животное или примат. Например, млекопитающее, отличное от человека, может быть мышью, крысой, собакой, свиньей, козой, овцой, коровой, обезьяной, бонобо, шимпанзе, макаком-резус или яванским макаком. Последовательность соединения на основе siRNA может быть комплементарной последовательностям в пределах гомологичных генов, например, онкогенов или генов-супрессоров опухолей, млекопитающего, отличного от человека, и человека. Определить токсичность соединения на основе siRNA у млекопитающего, отличного от человека, можно экстраполировать токсичность соединения на основе siRNA на таковую у человека. Для более интенсивного

теста на токсичность siRNA может быть комплементарной последовательностям человека и более чем одного, например, двух, трех или более, животных, отличных от человека.

Описанные в данном документе способы можно применять для корреляции любого физиологического эффекта соединения на основе siRNA в отношении человека, например, любого нежелательного эффекта, такого как токсический эффект, или любого положительного или желаемого эффекта.

Повышение клеточного поглощения siRNA.

В данном документе описаны различные композиции на основе siRNA, которые содержат ковалентно связанные конъюгаты, которые увеличивают клеточное поглощение и/или внутриклеточное нацеливание siRNA.

Дополнительно предусмотрены способы по настоящему изобретению, которые предусматривают введение соединения на основе siRNA и лекарственного средства, которое влияет на поглощение siRNA клеткой. Лекарственное средство можно вводить до, после или одновременно с введением соединения на основе siRNA. Лекарственное средство может быть ковалентно или нековалентно связано с соединением на основе siRNA. Например, лекарственным средством может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB. Лекарственное средство может оказывать на клетку временное действие. Лекарственное средство может увеличивать поглощение соединения на основе siRNA клеткой, например, за счет разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин. Лекарственное средство также может увеличивать поглощение соединения на основе siRNA в данной клетке или ткани, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лекарственные средства, которые могут иметь такой эффект, включают фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1 бета, мотив CpG, гамма-интерферон или, в более общем смысле, средство, которое активирует toll-подобный рецептор.

Получение siRNA.

siRNA можно получить, например, в большом количестве, различными способами. Примеры способов включают: органический синтез и расщепление РНК, например расщепление *in vitro*.

Органический синтез. siRNA может быть получена путем отдельного синтеза одноцепочечной молекулы РНК или каждой соответствующей цепи двухцепочечной молекулы РНК, после чего составляющие цепи могут затем подвергаться отжигу.

Для производства большого количества конкретной цепи РНК для данной siRNA можно применять большой биореактор, например OligoPilot II от Pharmacia Biotec AB (Упсала, Швеция). В реакторе OligoPilotII может происходить эффективное связывание нуклеотида с применением только 1,5-молярного избытка фосфорамидитного нуклеотида. Для создания цепи РНК используются рибонуклеотидные амидиты. Для синтеза цепи от 21 до 23 нуклеотидов для siRNA можно применять стандартные циклы добавления мономера. Как правило, две комплементарные цепи получают отдельно, а затем подвергают отжигу, например, после высвобождения из твердой основы и снятия защиты.

Для получения отдельного вида siRNA можно использовать органический синтез. Комплементарность вида конкретному целевому гену может быть точно определена. Например, вид может быть комплементарным к участку, который включает полиморфизм, например, полиморфизм одного нуклеотида. Далее расположение полиморфизма может быть точно определено. В некоторых вариантах осуществления полиморфизм расположен во внутреннем участке, например, на по меньшей мере 4, 5, 7 или 9 нуклеотидов от одного или обоих концов.

Расщепление dsRNA. siRNA также могут быть получены путем расщепления более крупных siRNA. Расщепление может быть опосредовано *in vitro* или *in vivo*. Например, для получения iRNA путем расщепления *in vitro* можно использовать приведенный ниже способ.

Транскрипция *in vitro*. dsRNA получают путем транскрипции сегмента нуклеиновой кислоты (ДНК) в обоих направлениях. Например, набор для транскрипции для RNAi HiScribe™ (New England Biolabs) обеспечивает вектор и способ получения dsRNA для сегмента нуклеиновой кислоты, который клонируется в вектор в положении, фланкированном с обеих сторон промотором T7. Созданы отдельные матрицы для транскрипции T7 двух комплементарных цепей dsRNA. Матрицы транскрибируются *in vitro* путем добавления РНК-полимеразы T7 и происходит выработка dsRNA. В аналогичных способах с применением PCR и/или других РНК-полимераз (например, полимеразы T3 или SP6) также могут быть дотоксины, которые могут загрязнять препараты рекомбинантных ферментов.

Расщепление *in vitro*. В одном варианте осуществления РНК, полученная этим способом, тщательно очищается для удаления концов. iRNA расщепляется *in vitro* на siRNA, например, с использованием Dicer или сопоставимой активности на основе РНКазы III. Например, dsRNA можно инкубировать *in vitro* в экстракте из *Drosophila* или с применением очищенных компонентов, например, очищенной РНКазы или комплекса RISC (комплекс РНК-индуцированного сайленсинга). См., например, Ketting et al. *Genes Dev* 2001 Oct 15; 15(20):2654-9, и Hammond Science 2001 Aug 10; 293(5532):1146-50.

Расщепление dsRNA, как правило, дает множество видов siRNA, каждый из которых представляет

собой конкретный фрагмент от 21 до 23 нуклеотидов исходной молекулы dsRNA. Например, могут присутствовать siRNA, которые включают последовательности, комплементарные перекрывающимся областям и смежным областям исходной молекулы dsRNA.

Независимо от способа синтеза препарат siRNA может быть получен в растворе (например, в водном и/или органическом растворе), который подходит для получения состава. Например, препарат siRNA можно осаждать и повторно растворять в чистой бидистиллированной воде и лиофилизировать. Затем высушенную siRNA можно ресуспендировать в растворе, подходящем для предполагаемого способа составления.

Создание средств на основе двухцепочечной iRNA, конъюгированных с липофильным фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством нуклеинового основания, сахарного фрагмента или межнуклеозидной связи.

Конъюгация с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может происходить в любом положении, в том числе по атомам внутри кольца и вне кольца. В некоторых вариантах осуществления к 2-, 6-, 7- или 8-положениям пуринового нуклеинового основания присоединен конъюгатный фрагмент. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть замещены конъюгатным фрагментом. Когда липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, предпочтительным положением является положение, которое не мешает гибридизации, т.е. не мешает взаимодействиям водородных связей, необходимых для спаривания оснований. В одном варианте осуществления липофильные фрагменты могут быть конъюгированы с нуклеиновым основанием посредством линкера, содержащего алкильную, алкенильную или амидную связь. Иллюстративные конъюгации липофильных фрагментов с нуклеиновым основанием проиллюстрированы на фиг. 1 и в примере 7.

Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Иллюстративные атомы углерода сахарного фрагмента, к которому может быть присоединен липофильный фрагмент, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. Липофильный фрагмент также может быть присоединен к 1'-положению, например к остатку с удаленным азотистым основанием. В одном варианте осуществления липофильные фрагменты могут быть конъюгированы с сахарным фрагментом посредством 2'-О-модификации, с линкером или без него. Иллюстративные конъюгации липофильных фрагментов с сахарным фрагментом (посредством 2'-О-модификации) проиллюстрированы на фиг. 1 и в примерах 1, 2, 3 и 6.

Межнуклеозидные связи также могут нести липофильные фрагменты. Что касается фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.), то липофильный фрагмент может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеозидных связей (например, PNA), липофильный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

Существует множество способов получения конъюгатов олигонуклеотидов. Как правило, олигонуклеотид присоединяется к конъюгатному фрагменту путем приведения в контакт реакционноспособной группы (например, OH, SH, амина, карбоксила, альдегида и т.п.) на олигонуклеотиде с реакционноспособной группой на конъюгатном фрагменте. В некоторых вариантах осуществления одна реакционноспособная группа является электрофильной, а другая представляет собой нуклеофильную.

Например, электрофильная группа может представлять собой карбонилсодержащую функциональную группу, а нуклеофильная группа может представлять собой амин или тиол. Способы конъюгации нуклеиновых кислот и родственных олигомерных соединений со связывающими группами и без них хорошо описаны в литературе, такой как, например, Manoharan in *Antisense Research and Applications*, Crooke and LeBleu, eds., CRC Press, Boca Raton, Fla., 1993, Chapter 17, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления первая (комплементарная) цепь РНК и вторая (смысловая) цепь РНК могут быть синтезированы отдельно, при этом одна из цепей РНК содержит боковой липофильный фрагмент, а первая и вторая цепи РНК могут быть смешаны с образованием dsRNA. Стадия синтеза цепи РНК предпочтительно включает твердофазный синтез, где отдельные нуклеотиды соединяются конец к концу через образование межнуклеотидных 3'-5'-фосфодиэфирных связей в последовательных циклах синтеза.

В одном варианте осуществления липофильная молекула, имеющая фосфорамидитную группу, связана с 3'-концом или 5'-концом либо первой (комплементарной), либо второй (смысловой) цепи РНК в последнем цикле синтеза. При твердофазном синтезе РНК нуклеотиды изначально находятся в форме нуклеозид-фосфорамидитов. В каждом цикле синтеза дополнительный нуклеозид-фосфорамидит связан с -ОН-группой ранее включенного нуклеотида. Если липофильная молекула имеет фосфорамидитную группу, она может быть связана аналогично нуклеозидному фосфорамидиту со свободным концом ОН РНК, синтезированной ранее в твердофазном синтезе. Синтез может происходить автоматическим и

стандартизированным способом с применением традиционного синтезатора РНК. Синтез липофильной молекулы, содержащей фосфорамидитную группу, может включать фосфитилирование свободного гидроксила с образованием фосфорамидитной группы.

Процедуры синтеза фосфорамидитов, конъюгированных с липофильными фрагментами, представлены в примерах 1, 2, 4, 5, 6 и 7. Примеры процедур пост-синтетической конъюгации липофильных фрагментов или других лигандов проиллюстрированы в примере 3.

В общем, олигонуклеотиды можно синтезировать с применением протоколов, известных в данной области, например, как описано в Caruthers et al., *Methods in Enzymology* (1992) 211:3-19; WO 99/54459; Wincott et al., *Nucl. Acids Res.* (1995) 23:2677-2684; Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, (1997) 74:59; Brennan et al., *Biotechnol. Bioeng.* (1998) 61:33-45; и патенте США № 6001311, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В общем, синтез олигонуклеотидов включает традиционные нуклеиновые кислоты, защитные и связывающие группы, такие как диметокситритил на 5'-конце и фосфорамидиты на 3'-конце. В неограничивающем примере мелкомасштабные синтезы производят на синтезаторе РНК Expedite 8909, продаваемом Applied Biosystems, Inc. (Вайтерштадт, Германия), с применением рибонуклеозидфосфорамидитов, продаваемых ChemGenes Corporation (Ашленд, штат Массачусетс, США). В качестве альтернативы, синтезы можно проводить на синтезаторе с 96-луночным планшетом, таком как прибор, произведенный Protogene (Пало-Альто, штат Калифорния, США), или посредством способов, например, описанных в Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1987) 109:7845; Scaringe, et al., *Nucl. Acids Res.* (1990) 18:5433; Wincott, et al., *Nucl. Acids Res.* (1990) 23:2677-2684 и Wincott, et al., *Methods Mol. Bio.* (1997) 74:59, раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Молекулы нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть синтезированы отдельно и соединены вместе постсинтетически, например, путем лигирования (Moore et al., *Science* (1992) 256:9923; WO 93/23569; Shabarova et al., *Nucl. Acids Res.* (1991) 19:4247; Bellon et al., *Nucleosides & Nucleotides* (1997) 16:951; Bellon et al., *Bioconjugate Chem.* (1997) 8:204; или посредством гибридизации после синтеза и/или снятия защиты. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть очищены посредством гель-электрофореза с использованием традиционных способов или могут быть очищены с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC; см. Wincott et al., выше, совокупность которых указана в данном документе посредством ссылки) и повторно суспендированы в воде.

Фармацевтические композиции.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая включает соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например соединение на основе более крупной siRNA, которая может быть процессирована в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA, или их предшественник), включающее нуклеотидную последовательность, комплементарную целевой РНК, например, существенно и/или полностью комплементарную. Целевая РНК может представлять собой транскрипт эндогенного гена человека. В одном варианте осуществления соединение на основе siRNA (a) имеет длину 19-25 нуклеотидов, например 21-23 нуклеотида, (b) комплементарно эндогенной целевой РНК и, необязательно, (c) включает по меньшей мере один 3'-выступ из 1-5 нт. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть эмульсией, микроэмульсией, кремом, желе или липосомой.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит соединение на основе siRNA, смешанное со средством для местной доставки. Средство для местной доставки может представлять собой множество микроскопических везикул. Микроскопические везикулы могут представлять собой липосомы. В некоторых вариантах осуществления липосомы представляют собой катионные липосомы.

В другом аспекте фармацевтическая композиция включает соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например, соединение на основе более крупной siRNA, которая может быть процессирована в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA, или их предшественник), смешанное с местным усилителем проникновения. В одном варианте осуществления местный усилитель проникновения представляет собой жирную кислоту. Жирные кислоты могут представлять собой арахидоновую 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-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C₁₋₁₀алкильные эфиры, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления местный усилитель проникновения представляет собой соль желчных кислот. Соль желчных кислот может быть солью холевой кислоты, дегидрохоловой кислоты, дезоксихоловой кислоты, глюкохоловой кислоты, гликохоловой кислоты, гликодезоксихоловой кислоты, таурохолевой кислоты, тауродезоксихоловой кислоты, хенодезоксихоловой кислоты, урсодезоксихоле-

вой кислоты, тауро-24,25-дигидрофузидатом натрия, гликодигидрофузидатом натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловым эфиром или их фармацевтически приемлемой солью.

В другом варианте осуществления усилитель проникновения представляет собой хелатирующее средство. Хелатирующее средство может представлять собой ЭДТА, лимонную кислоту, салицилат, N-ацильное производное коллагена, лаурет-9, N-аминоацильное производное бета-дикетона или их смесь.

В другом варианте осуществления усилитель проникновения представляет собой поверхностно-активное вещество, например ионное или неионогенное поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может представлять собой лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир, перфторхимическую эмульсию или их смесь.

В другом варианте осуществления усилитель проникновения может быть выбран из группы, состоящей из ненасыщенных циклических мочевины, 1-алкил-алконов, 1-алкенилазациклоалканонов, стероидных противовоспалительных средств и их смесей. В еще одном варианте осуществления усилитель проникновения может представлять собой гликоль, пиррол, азон или терпены.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в форме, подходящей для пероральной доставки. В одном варианте осуществления пероральная доставка может использоваться для доставки композиции соединения на основе siRNA в клетку или участок желудочно-кишечного тракта, например тонкую кишку, толстую кишку (например, для лечения рака толстой кишки), и так далее. Форма для пероральной доставки может представлять собой таблетки, капсулы или гелевые капсулы. В одном варианте осуществления соединение на основе siRNA фармацевтической композиции модулирует экспрессию белка клеточной адгезии, модулирует скорость клеточной пролиферации или обладает биологической активностью против эукариотических патогенов или ретровирусов. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция включает растворимый в кишечнике материал, который по сути предотвращает растворение таблеток, капсул или гелевых капсул в желудке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления растворимый в кишечнике материал представляет собой покрытие. Покрытие может представлять собой фталат ацетата, пропиленгликоль, монолеат сорбитана, тримеллитат ацетата целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы или фталат ацетата целлюлозы.

В другом варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит усилитель проникновения. Усилитель проникновения может быть солью желчной кислоты или жирной кислотой. Соль желчной кислоты может представлять собой урсодезоксихолевую кислоту, хенодезоксихолевую кислоту и их соли. Жирная кислота может представлять собой каприновую кислоту, лауриновую кислоту и их соли.

В другом варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит вспомогательное вещество. В одном примере вспомогательное вещество представляет собой полиэтиленгликоль. В другом примере вспомогательное вещество представляет собой прецирол.

В другом варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит пластификатор. Пластификатор может представлять собой диэтилфталат, триацетиндибутилсебацат, дибутилфталат или триэтилцитрат.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA и носитель для доставки. В одном варианте осуществления соединение на основе siRNA имеет длину: (a) 19-25 нуклеотидов, например 21-23 нуклеотида, (b) комплементарно эндогенной целевой РНК и, необязательно, (c) включает по меньшей мере один 3'-выступ длиной 1-5 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления носитель для доставки может обеспечивать доставку соединения на основе siRNA, например, соединения на основе двухцепочечной siRNA или соединения на основе ssiRNA (например, предшественник, например соединение на основе более крупной siRNA, которая может быть процессирована в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или их предшественник), в клетку путем местного пути введения. Носитель для доставки может быть в виде микроскопических везикул. В одном примере микроскопические везикулы представляют собой липосомы. В некоторых вариантах осуществления липосомы представляют собой катионные липосомы. В другом примере микроскопические везикулы представляют собой мицеллы. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например, более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в инъекционной лекарственной форме. В одном варианте осуществления инъекционная лекарст-

венная форма фармацевтической композиции включает стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки. В некоторых вариантах осуществления стерильный раствор может включать разбавитель, такой как вода; физиологический раствор; жирные масла, полиэтиленгликоль, глицерин или пропиленгликоль.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например, более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в пероральной лекарственной форме. В одном варианте осуществления пероральная лекарственная форма выбрана из группы, состоящей из таблеток, капсул и гелевых капсул. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция включает растворимый в кишечнике материал, который по сути предотвращает растворение таблеток, капсул или гелевых капсул в желудке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления растворимый в кишечнике материал представляет собой покрытие. Покрытие может представлять собой фталат ацетата, пропиленгликоль, монолеат сорбитана, тримеллитат ацетата целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы или фталат ацетата целлюлозы. В одном варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит усилитель проникновения, например усилитель проникновения, описанный в данном документе.

В другом варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит вспомогательное вещество. В одном примере вспомогательное вещество представляет собой полиэтиленгликоль. В другом примере вспомогательное вещество представляет собой прецирол.

В другом варианте осуществления пероральная лекарственная форма фармацевтической композиции содержит пластификатор. Пластификатор может представлять собой диэтилфталат, триацетиндибутилсебацат, дибutilфталат или триэтилцитрат.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в ректальной лекарственной форме. В одном варианте осуществления ректальная лекарственная форма представляет собой клизму. В другом варианте осуществления ректальная лекарственная форма представляет собой суппозиторий.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в вагинальной лекарственной форме. В одном варианте осуществления вагинальная лекарственная форма представляет собой суппозиторий. В другом варианте осуществления вагинальная лекарственная форма представляет собой пену, крем или гель.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), в легочной или назальной лекарственной форме. В одном варианте осуществления соединение на основе siRNA включено в частицу, например макрочастицу, например микросферу. Частица может быть получена распылительной сушкой, лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, вакуумной сушкой или их комбинацией. Микросферы могут быть получены в виде суспензии, порошка или имплантируемого твердого вещества.

Способы лечения и пути доставки.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу уменьшения экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающему приведение в контакт указанной клетки со средством на основе двухцепочечной siRNA по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку, находящуюся за пределами печени.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу уменьшения экспрессии целевого гена у субъекта, предусматривающему введение субъекту средства на основе двухцепочечной siRNA по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, страдающего нарушением ЦНС, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного средства для RNAi по настоящему изобретению, с осуществлением тем самым лечения

субъекта. Иллюстративные нарушения ЦНС, которые можно подвергать лечению с помощью способа по настоящему изобретению, включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височную деменцию, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, спиноцеребеллярные, прионные нарушения и болезнь Лафора.

Средство на основе двухцепочечной iRNA по настоящему изобретению может быть доставлено субъекту различными путями в зависимости от типа целевых генов и типа заболеваний, подлежащих лечению. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA вводят внепеченочным путем, например, глазное введение (например, интравитреальное введение) или интратекальное введение.

В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA вводят интратекальным путем. Путем интратекального введения средства на основе двухцепочечной iRNA с помощью данного способа можно обеспечить снижение экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга, например в коре головного мозга, мозжечке, шейном отделе спинного мозга, поясничном отделе спинного мозга и грудном отделе спинного мозга.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные целевые гены представляют собой APP, ATXN2, C9orf72, TARDBP, MAPT(Tau), HTT, SNCA, FUS, ATXN3, ATXN1, SCA1, SCA7, SCA8, MeCP2, PRNP, SOD1, DMPK и TTR. Для снижения экспрессии данных целевых генов у субъекта, средство на основе двухцепочечной iRNA можно вводить интравитреально. Путем интравитреального введения средства на основе двухцепочечной iRNA способ может обеспечить снижение экспрессии целевого гена в ткани глаза.

Для простоты изложения состава, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений на основе модифицированной siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями на основе siRNA, например соединениями на основе немодифицированной siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Композиция, включающая iRNA, может быть доставлена субъекту с помощью разных путей. Иллюстративные пути включают: внутривенный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, интраназальный, легочной, глазной.

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

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (в том числе офтальмическим, вагинальным, ректальным, интраназальным, трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное введение, подкожную, внутривентрикулярную или внутримышечную инъекцию или интратекальное или интравентрикулярное введение.

Путь и место введения можно выбирать для усиления нацеливания. Например, для целенаправленного воздействия на мышечные клетки логическим выбором будет внутримышечная инъекция в мышцы, представляющие интерес. Целенаправленно воздействовать на клетки легких можно путем введения iRNA в форме аэрозоля. Целенаправленно воздействовать на клетки эндотелия сосудов можно путем нанесения iRNA на баллонный катетер и механического введения ДНК.

Составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть общепринятые фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.д. Также можно использовать презервативы, перчатки с покрытием 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 использовать, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках, как правило, используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсул подходящими разбавителями являются лактоза и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, композиции нуклеиновых кислот можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими средствами. При желании могут быть добавлены определенные подсластители и/или ароматизаторы.

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. Интравентрикулярная инъекция может быть облегчена с помощью интравентрикулярного катетера, например, прикрепленного к резервуару. При внутривенном применении можно контролировать общую концентрацию растворенных веществ для обеспечения изотоничности препарата.

Для глазного введения мази или жидкости для закапывания могут быть доставлены с помощью систем доставки в глаза, известных в уровне техники, таких как аппликаторы или глазные капельницы. Такие композиции могут включать мукомиметики, такие как гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливиниловый спирт, консерванты, такие как сорбиновая кислота, EDTA или хлорид бензилхрония, и стандартные количества разбавителей и/или носителей.

В одном варианте осуществления введение композиции соединения на основе siRNA, например, соединения на основе двухцепочечной siRNA или соединения на основе ssiRNA, проводят с помощью парентерального, например, внутривенного (например, в виде болюсной или диффундирующей инфузии), внутрикожного, внутрибрюшинного, внутримышечного, интратекального, интравентрикулярного, интракраниального, подкожного, чресслизистого, трансбуккального, сублингвального, эндоскопического, ректального, перорального, вагинального, местного, легочного, интраназального, уретрального или глазного путей. Введение может осуществляться субъектом или другим лицом, например медицинским работником. Лекарственный препарат может обеспечиваться в виде отмеренных доз или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные режимы доставки более подробно обсуждаются ниже.

Интратекальное введение. В одном варианте осуществления средство на основе двухцепочечной iRNA доставляют посредством интратекальной инъекции (т.е. инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Интратекальная инъекция средств на основе iRNA в спинномозговую жидкость может выполняться в виде болюсной инъекции или с помощью мини-помп, которые можно имплантировать под кожу, обеспечивая регулярную и постоянную доставку siRNA в спинномозговую жидкость. Посредством циркуляции спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения, где она вырабатывается, вниз вокруг спинного мозга и ганглиев задних корешков, а затем вверх через мозжечок и по коре к паутинным грануляциям, где жидкость может выйти из ЦНС, т.е. в зависимости от размера, стабильности и растворимости вводимых соединений, молекулы, доставленные интратекально, могут достигать цели по всей ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляют посредством помпы. Помпа может представлять собой осмотическую помпу, имплантированную хирургическим путем. В одном варианте осуществления осмотическая помпа имплантируется в субарахноидальное пространство позвоночного канала для облегчения интратекального введения.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляется через систему интратекальной доставки фармацевтического препарата, включающую резервуар, содержащий объем фармацевтического средства, и помпу, сконфигурированную для доставки части фармацевтического средства, содержащегося в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе интратекальной доставки можно найти в документе PCT/US2015/013253, поданном 28 января 2015 г., который включен посредством ссылки в полном объеме.

Количество вводимых интратекально средств на основе iRNA может варьироваться от одного целевого гена к другому целевому гену, и подходящее количество, которое должно быть применено, может быть определено индивидуально для каждого целевого гена. Как правило, это количество составляет от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

Ректальное введение. В настоящем изобретении также предусмотрены способы, композиции и наборы для ректального введения или доставки описанных в данном документе соединений на основе siRNA.

Соответственно, соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), описанное в данном документе, например, терапевтически эффективное количество соединения на основе siRNA, описанного в данном документе, например, соединения на основе siRNA, имеющего двухцепочечный участок менее 40, и, например, менее 30 нуклеотидов и с одним или двумя 1-3 нуклеотидными одноцепочечными 3'-выступами можно вводить ректально, например через прямую кишку в нижнюю или верхнюю ободочную кишку. Этот подход в частности применим при лечении воспалительных заболеваний, нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например полипов или рака толстой кишки.

Лекарственный препарат может быть доставлен к месту в толстой кишке путем введения дозирующего устройства, например гибкого устройства с управлением камерой, аналогичного тому, которое используется для осмотра толстой кишки или удаления полипов, которое включает средства для доставки лекарственного препарата.

Ректальное введение соединения на основе siRNA осуществляется посредством клизмы. Соединение на основе siRNA для клизмы можно растворить в физиологическом растворе или буферном растворе. Ректальное введение также может осуществляться с помощью суппозитория, который может включать другие ингредиенты, например, вспомогательное вещество, например масло какао или гидропропилметилцеллюлозу.

Глазное введение. Описанные в данном документе средства на основе iRNA можно вводить в ткань глаза. Например, лекарственные препараты можно наносить на поверхность глаза или близлежащие ткани, например на внутреннюю часть века. Их можно наносить местно, например путем распыления, в виде капель, в виде раствора для промывания глаз или в виде мази. Введение может осуществляться субъектом или другим лицом, например медицинским работником. Лекарственный препарат может обеспечиваться в виде отмеренных доз или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Лекарственный препарат также можно вводить во внутреннюю часть глаза и вводить с помощью иглы или другого устройства для доставки, которое может ввести его в выбранную область или структуру. Глазная обработка в частности желательна для лечения воспаления глаза или близлежащих тканей.

В определенных вариантах осуществления средства на основе двухцепочечной iRNA могут быть доставлены непосредственно в глаз путем инъекции в ткань глаза, такой как периокулярная, конъюнктивальная, субтенозная, внутрикамерная, интравитреальная, внутриглазная, передняя или задняя юкстасклеральная, субретинальная, субконъюнктивальная, ретробульбарная или интраканаликулярная инъекции; путем непосредственного нанесения на глаз с использованием катетера или другого устройства для размещения, например ретинальная гранула, внутриглазная вставка, суппозиторий или имплантат, содержащий пористый, непористый или гелеобразный материал; посредством местных глазных капель или мазей; или с помощью устройства с медленным высвобождением в свод, или имплантированного рядом со склерой (трансклеральный), или в склере (интрасклеральный), или внутри глаза. Внутрикамерная инъекция может производиться через роговицу в переднюю камеру для обеспечения средству достижения трабекулярной сети. Интраканаликулярная инъекция может производиться в венозные коллекторные каналы, дренажирующие канал Шлемма, или в канал Шлемма.

В одном варианте осуществления средства на основе двухцепочечной iRNA можно вводить в глаз, например в стекловидное тело глаза, путем интравитреальной инъекции, например, с помощью предварительно заполненных шприцев в форме, готовой к инъекции, для применения медицинским персоналом.

Для офтальмологической доставки средства на основе двухцепочечной iRNA могут быть объединены с офтальмологически приемлемыми консервантами, соразработчиками, поверхностно-активными веществами, усилителями вязкости, усилителями проникновения, буферами, хлоридом натрия или водой с образованием водной стерильной офтальмологической суспензии или раствора. Составы в виде растворов можно приготовить растворением конъюгата в физиологически приемлемом изотоническом водном буфере. Кроме того, раствор может включать приемлемое поверхностно-активное вещество, способствующее растворению средств на основе двухцепочечной iRNA. Средства, повышающие вязкость, например, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза, поливинилпирролидон и т.п., могут быть добавлены к фармацевтическим композициям для улучшения удерживания средств на основе двухцепочечной iRNA.

Для получения стерильной офтальмологической мази средства на основе двухцепочечной iRNA комбинируют с консервантом в подходящем носителе, таком как минеральное масло, жидкий ланолин или белый вазелин. Стерильные офтальмологические гелевые составы могут быть получены путем суспендирования средств на основе двухцепочечной iRNA в гидрофильной основе, полученной из комбинации, например, CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Шарлотт, штат Северная Каролина, США) или подобного, в соответствии со способами, известными из уровня техники.

Местная доставка. Любое из соединений на основе siRNA, описанных в данном документе, можно применять непосредственно на коже. Например, лекарственный препарат можно наносить местно или доставлять в слой кожи, например, с помощью микроиглы или батареи микроигл, которые проникают в кожу, но, например, не в подлежащую мышечную ткань. Введение композиции соединения на основе siRNA может быть местным. При местном применении композиция может быть доставлена, например, в дерму или эпидермис субъекта. Местное введение может быть в форме трансдермальных пластырей, мазей, лосьонов, кремов, гелей, капель, суппозитория, спреев, жидкостей или порошков. Композиция для местного применения может быть получена в виде липосомы, мицеллы, эмульсии или другой липофильной молекулярной сборки. Трансдермальное введение можно применять по меньшей мере с одним усилителем проникновения, таким как ионофорез, фонофорез и сонофорез.

Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений на основе немодифицированной siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями на основе siRNA, например соединениями на основе немодифицированной siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе siRNA, например, соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например,

предшественник, например соединение на основе более крупной siRNA, которая может быть процессирована в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник), вводят субъекту путем местного введения. "Местное введение" относится к доставке субъекту путем приведения в контакт состава непосредственно с поверхностью субъекта. Наиболее распространенной формой местной доставки является применение к коже, но описанная в данном документе композиция также может быть непосредственно нанесена на другие поверхности тела, например на глаз, на слизистую оболочку, на поверхности полости тела или на внутреннюю поверхность. Как упоминалось выше, наиболее распространенная местная доставка представляет собой доставку через кожу. Данный термин охватывает несколько путей введения, в том числе без ограничения местный и трансдермальный. Эти способы введения обычно включают проникновение через барьер кожной проницаемости и эффективную доставку к целевой ткани или слою. Местное введение можно использовать как средство для проникновения в эпидермис и дерму и, в конечном итоге, для достижения системной доставки композиции. Местное введение также можно использовать как средство для селективной доставки олигонуклеотидов в эпидермис или дерму субъекта, или в их определенные слои, или в подлежащую ткань.

Как используется в данном документе термин "кожа" относится к эпидермису и/или дерме животного. Кожа млекопитающих состоит из двух основных отдельных слоев. Внешний слой кожи называется эпидермисом. Эпидермис состоит из рогового слоя, зернистого слоя, шиловидного слоя и базального слоя, при этом роговой слой находится на поверхности кожи, а базальный слой является самой глубокой частью эпидермиса. Толщина эпидермиса составляет от 50 мкм до 0,2 мм, в зависимости от его расположения на теле.

Под эпидермисом находится дерма, которая значительно толще эпидермиса. Дерма в основном состоит из коллагена в виде фиброзных пучков. Коллагеновые пучки обеспечивают поддержку, среди прочего, кровеносных сосудов, лимфатических капилляров, желез, нервных окончаний и иммунологически активных клеток.

Одна из основных функций кожи как органа представляет собой регуляцию поступления веществ в организм. Основной барьер кожной проницаемости обеспечивается роговым слоем, который образован из многих слоев клеток в различных состояниях дифференцировки. Пространства между клетками в роговом слое заполнены различными липидами, расположенными в виде решетчатых образований, которые обеспечивают герметизацию для дальнейшего повышения барьера кожной проницаемости.

Барьер проницаемости, обеспечиваемый кожей, таков, что он в значительной степени непроницаем для молекул с молекулярной массой более приблизительно 750 Да. Чтобы более крупные молекулы пересекли барьер кожной проницаемости, необходимо использовать механизмы, отличные от нормального осмоса.

Несколько факторов определяют проницаемость кожи для вводимых средств. Эти факторы включают характеристики обработанной кожи, характеристики средства для доставки, взаимодействия между лекарственным средством и средством для доставки и лекарственным средством и кожей, дозу применяемого лекарственного средства, форму лечения и режим после лечения. Для избирательного нацеливания на эпидермис и дерму иногда можно составить композицию, содержащую один или несколько усилителей проникновения, которые обеспечивают проникновение лекарственного средства в заранее выбранный слой.

Трансдермальная доставка является ценным способом введения жирорастворимых терапевтических средств. Дерма более проницаема, чем эпидермис, поэтому абсорбция происходит намного быстрее через истертую, обожженную или обнаженную кожу. Воспаление и другие физиологические состояния, которые увеличивают приток крови к коже, также усиливают трансдермальную адсорбцию. Абсорбция по этому пути может быть увеличена за счет применения масляного носителя (соединение) или за счет применения одного или нескольких усилителей проникновения. Другие эффективные способы доставки композиции, раскрытой в данном документе, трансдермальным путем, включают гидратацию кожи и применение местных пластырей с контролируемым высвобождением. Трансдермальный путь обеспечивает потенциально эффективные средства доставки раскрытой в данном документе композиции для системной и/или местной терапии.

Кроме того, ионофорез (перенос ионных растворенных веществ через биологические мембраны под действием электрического поля) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 163), фонофорез или сонофорез (использование ультразвука для усиления абсорбции различных терапевтических средств через биологические мембраны, в частности, кожу и роговицу) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 166), и оптимизация характеристик носителя относительно положения и удержания дозы в место введения (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 168) могут быть полезными способами для улучшения транспорта композиций для местного применения через кожу и участки слизистой оболочки.

Предоставленные композиции и способы также могут быть использованы для исследования функции различных белков и генов *in vitro* в культивируемых или консервированных кожных тканях и у животных. Таким образом, настоящее изобретение можно применять для изучения функции любого гена.

Способы по настоящему изобретению также можно применять терапевтически или профилактически. Например, для лечения животных, которые, как известно или подозревается, страдают такими заболеваниями, как псориаз, красный плоский лишай, токсический эпидермальный некролиз, мультиформная эритема, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточный рак, злокачественная меланома, болезнь Паджета, саркома Капоши, фиброз легких, болезнь Лайма и вирусные, грибковые и бактериальные инфекции кожи.

Легочная доставка. Любое из соединений на основе siRNA, описанных в данном документе, можно вводить в легочную систему. Легочное введение может быть достигнуто путем ингаляции или введения устройства доставки в легочную систему, например, путем введения устройства доставки, которое может выдавать порцию лекарственного препарата. В определенных вариантах осуществления может использоваться способ легочной доставки путем ингаляции. Лекарственный препарат может быть предоставлен в дозаторе, который доставляет лекарственный препарат, например влажный или сухой, в достаточно мелкой форме, чтобы его можно было вдохнуть. Устройство может подавать отмеренную дозу лекарственного препарата. Субъект или другой человек может вводить лекарственный препарат. Легочная доставка эффективна не только при заболеваниях, которые непосредственно влияют на легочную ткань, но также и при нарушениях, которые влияют на другие ткани. Соединения на основе siRNA могут быть составлены в виде жидких или отличных от жидких формах, например в виде порошка, кристалла или аэрозоля для легочной доставки.

Для простоты изложения состава, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений на основе модифицированной siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями на основе siRNA, например соединениями на основе немодифицированной siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Композиция, которая включает соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA (например, предшественник, например, более крупную siRNA, которая может быть процессирована в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или их предшественник), может быть введена субъекту посредством легочной доставки. Композиции для легочной доставки могут доставляться пациентом путем ингаляции дисперсии, таким образом, что композиция, например iRNA, в дисперсии может достигать легких, где она может легко всасываться через альвеолярную область непосредственно в кровоток. Легочная доставка может быть эффективной как для системной доставки, так и для локальной доставки для лечения заболеваний легких.

Легочная доставка может быть достигнута посредством различных подходов, в том числе применение небулайзированных, аэрозольных, мицеллюлярных и сухих порошковых составов. Доставка может быть достигнута с помощью жидких небулайзеров, аэрозольных ингаляторов и устройств для распыления сухих порошков. Можно использовать дозирующие устройства. Одно из преимуществ применения распылителя или ингалятора заключается в том, что вероятность загрязнения сводится к минимуму, поскольку устройства являются автономными. Устройства для распыления сухого порошка, например, доставляют лекарственные средства, которые могут быть легко составлены в виде сухих порошков. Композиция на основе iRNA может стабильно храниться в виде лиофилизированных или высушенных распылением порошков сама по себе или в сочетании с подходящими порошковыми носителями. Доставка композиции для ингаляции может быть опосредована элементом времени дозирования, который может включать таймер, счетчик доз, устройство измерения времени или индикатор времени, который при включении в устройство позволяет отслеживать дозу, контроль соблюдения режима дозирования и/или срабатывание дозы пациента во время введения лекарственного препарата в виде аэрозоля.

Термин "порошок" означает композицию, которая состоит из мелкодисперсных твердых частиц, которые свободно текут и могут легко распыляться в ингаляционном устройстве и впоследствии вдыхаться субъектом, так что частицы достигают легких, за счет чего обеспечивается проникновение в альвеолы. Таким образом, порошок считается "пригодным для вдыхания". Например, средний размер частиц составляет менее приблизительно 10 мкм в диаметре с относительно равномерным распределением сферической формы. В некоторых вариантах осуществления диаметр составляет менее приблизительно 7,5 мкм, а в некоторых вариантах осуществления - менее приблизительно 5,0 мкм. Как правило, распределение частиц по размеру составляет от приблизительно 0,1 мкм до приблизительно 5 мкм в диаметре, иногда от приблизительно 0,3 мкм до приблизительно 5 мкм.

Термин "сухой" означает, что композиция характеризуется содержанием влаги ниже приблизительно 10% по массе (мас.%) воды, как правило, ниже приблизительно 5 мас.%, а в некоторых случаях меньше приблизительно 3 мас.%. Сухая композиция может быть такой, что частицы легко диспергируются в ингаляционном устройстве с образованием аэрозоля.

Термин "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, присутствующее в композиции, которое необходимо для обеспечения желаемого уровня лекарственного средства у подлежащего лечению субъекта, чтобы вызвать ожидаемый физиологический ответ.

Термин "физиологически эффективное количество" означает количество, доставляемое субъекту

для получения желаемого паллиативного или лечебного эффекта.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает, что носитель может попадать в легкие без значительного вредного токсикологического воздействия на легкие.

Типы фармацевтических вспомогательных веществ, которые можно использовать в качестве носителя, включают стабилизаторы, такие как сывороточный альбумин человека (HSA), наполнители, такие как углеводы, аминокислоты и полипептиды; регуляторы pH или буферы; соли, такие как хлорид натрия; и тому подобное. Эти носители могут быть в кристаллической или аморфной форме или могут быть их смесью.

Особенно ценные наполнители включают совместимые углеводы, полипептиды, аминокислоты или их комбинации. Подходящие углеводы включают моносахариды, такие как галактоза, D-манноза, сорбоза и тому подобное; дисахариды, такие как лактоза, трегалоза и тому подобное; циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин; и полисахариды, такие как рафиноза, мальтодекстрины, декстраны и тому подобное; альдиты, такие как маннит, ксилит и тому подобное. Группа углеводов может включать лактозу, трегалозу, мальтодекстрины рафинозы и маннит. Подходящие полипептиды включают аспартам. Аминокислоты включают аланин и глицин, причем в некоторых вариантах осуществления используется глицин.

Добавки, которые являются второстепенными компонентами композиции по настоящему изобретению, могут быть включены для конформационной стабильности во время распылительной сушки и для улучшения диспергируемости порошка. Эти добавки включают гидрофобные аминокислоты, такие как триптофан, тирозин, лейцин, фенилаланин и тому подобное.

Подходящие регуляторы pH или буферы включают органические соли, полученные из органических кислот и оснований, такие как цитрат натрия, аскорбат натрия и тому подобное; цитрат натрия можно использовать в некоторых вариантах.

Легочное введение мицеллярного состава iRNA может быть достигнуто с помощью устройств для отмеренного дозирования пропеллентов, таких как тетрафторэтан, гептафторэтан, диметилфторпропан, тетрафторпропан, бутан, изобутан, диметиловый эфир и другие пропелленты, не содержащие CFC и содержащие CFC.

Пероральная и назальная доставка. Любое из соединений на основе siRNA, описанных в данном документе, можно вводить перорально, например в форме таблеток, капсул, гелевых капсул, таблеток для рассасывания, пастилок или жидких сиропов. Кроме того, композицию можно наносить местно на поверхность ротовой полости.

Любое из соединений на основе siRNA, описанных в данном документе, можно вводить назальным путем. Назальное введение может быть достигнуто путем введения устройства доставки в нос, например, путем введения устройства доставки, которое может выдавать порцию лекарственного препарата. Способы назальной доставки включают введение спрея, аэрозоля, жидкости, например, по каплям или путем местного введения на поверхность носовой полости. Лекарственный препарат может быть предоставлен в дозаторе, который доставляет лекарственный препарат, например влажный или сухой, в достаточно мелкой форме, чтобы его можно было вдохнуть. Устройство может подавать отмеренную дозу лекарственного препарата. Субъект или другой человек может вводить лекарственный препарат.

Назальная доставка эффективна не только при заболеваниях, которые непосредственно влияют на ткань носа, но также и при нарушениях, которые влияют на другие ткани. Соединения на основе siRNA могут быть составлены в виде жидких или отличных от жидких формах, например в виде порошка, кристалла или аэрозоля для назальной доставки. Как используется в данном документе термин "кристаллический" описывает твердое тело, имеющее структуру или характеристики кристалла, т.е. частицы трехмерной структуры, в которых плоские грани пересекаются под определенными углами и в которых имеется регулярная внутренняя структура. Композиции по настоящему изобретению могут иметь разные кристаллические формы. Кристаллические формы могут быть получены посредством ряда способов, в том числе, например, распылительной сушкой.

Для простоты изложения состава, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений на основе модифицированной siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями на основе siRNA, например соединениями на основе немодифицированной siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Оболочки полости рта и носа предоставляют преимущества для соответствующего пути введения по сравнению с другими способами введения. Например, лекарственные средства, вводимые через эти мембраны, характеризуются быстрым началом действия, обеспечивают терапевтические уровни в плазме крови, избегают эффекта первого прохождения метаболизма в печени и избегают воздействия на лекарственное средство вредоносной желудочно-кишечной (GI) среды. Дополнительные преимущества включают легкий доступ к участкам мембраны, таким образом, что лекарственное средство можно легко нанести, локализовать и удалить.

При пероральной доставке композиции могут быть нацелены на поверхность ротовой полости, например, на подъязычную слизистую оболочку, которая включает мембрану вентральной поверхности языка и дна рта, или слизистую оболочку щеки, которая составляет подкладку щеки. Слизистая оболочка

подъязычной области относительно проницаема, что обеспечивает быстрое всасывание и приемлемую биодоступность многих лекарственных средств. Кроме того, подъязычная слизистая оболочка удобна, приемлема и легкодоступна.

Способность молекул проникать через слизистую оболочку рта, по-видимому, связана с размером молекул, растворимостью липидов и ионизацией пептидных белков. Небольшие молекулы, менее 1000 дальтон, быстро проходят через слизистую оболочку. По мере увеличения размера молекулы проницаемость быстро уменьшается. Жирорастворимые соединения более проницаемы, чем не растворимые в липидах молекулы. Максимальное поглощение происходит, когда молекулы неионизированы или имеют нейтральный электрический заряд. Следовательно, заряженные молекулы представляют собой самые большие сложности при всасывании через слизистые оболочки полости рта.

Фармацевтическую композицию на основе iRNA можно также вводить в ротовую полость человека путем распыления в полость, без ингаляции, из дозирующего распылителя, смешанного мицеллярного фармацевтического состава, как описано выше, и пропеллента. В одном варианте осуществления дозатор сначала встряхивают перед распылением фармацевтического состава и пропеллента в ротовую полость. Например, лекарственный препарат можно распылять в ротовую полость или наносить непосредственно, например в жидкой, твердой или гелевой форме, на поверхность в ротовой полости. Это введение особенно желательно для лечения воспалений ротовой полости, например десен или языка, например, в одном варианте осуществления буккальное введение осуществляется путем распыления в полость, например без ингаляции, из дозатора, например дозирующего спрей дозатора, который дозирует фармацевтическую композицию и пропеллент.

Один аспект настоящего изобретения также относится к способу доставки олигонуклеотида в ЦНС путем интратекальной доставки или в ткань глаза путем интравитреального введения.

Некоторые варианты осуществления относятся к способу снижения экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающему приведение в контакт указанной клетки с олигонуклеотидом, имеющим один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с олигонуклеотидом, необязательно посредством линкера или носителя. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку в системе ЦНС. В одном варианте осуществления клетка представляет собой глазную клетку.

Некоторые варианты осуществления относятся к способу снижения экспрессии целевого гена у субъекта, предусматривающему введение субъекту олигонуклеотида, имеющего один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с олигонуклеотидом, необязательно посредством линкера или носителя. В одном варианте осуществления олигонуклеотидный конъюгат вводят интратекально (для уменьшения экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга). В одном варианте осуществления олигонуклеотидный конъюгат вводят интратекально (для уменьшения экспрессии целевого гена в ткани глаза).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является двухцепочечным. В одном варианте осуществления олигонуклеотид представляет собой средство на основе двухцепочечной iRNA, содержащее антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену, и смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид является одноцепочечным. В одном варианте осуществления олигонуклеотид является антисмысловым.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере одной цепи олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или несколькими концевыми положениями по меньшей мере одной цепи олигонуклеотида.

Наборы.

В определенных других аспектах настоящего изобретения представлены наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения на основе siRNA, например соединения на основе двухцепочечной siRNA или соединения на основе ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение на основе siRNA, которое может быть преобразовано в соединение на основе ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение на основе siRNA, например соединение на основе двухцепочечной siRNA или соединение на основе ssiRNA или его предшественник). В определенных вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтического состава могут находиться в одном контейнере. В качестве альтернативы может быть желательно предоставить компоненты фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, в одном контейнере для препарата соединения на основе siRNA и, по меньшей мере, в другом для соединения-носителя. Набор может быть упакован в несколько различных конфигураций, например, один или несколько контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии с описанным в данном документе способом, например, для получения и введения фармацевтической композиции. В комплект также может входить устройство для доставки.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как дополнительно ограничивающие. Содержание всех ссылок, заявок на патент, на-

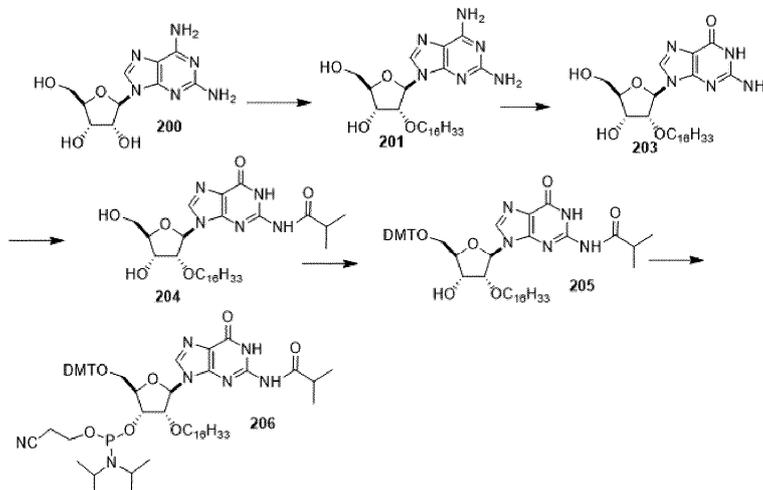
ходящихся на рассмотрении, и опубликованных патентов, цитируемых на протяжении данной заявке, тем самым явным образом включено посредством ссылки.

Примеры

Теперь, когда настоящее изобретение в целом описано, его можно будет легче понять, обратившись к нижеследующим примерам, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Синтез нуклеозидфосфорамидитов для синтеза липофильных конъюгатов.

Схема 1



Синтез соединения 201. Гидрид натрия (NaH) (21 г) добавляли к 2,6-диамино-9-(β-О-рибофуранозил)пурину 200 (105 г) в сухом диметилформамиде (DMF) (1500 мл). После перемешивания в течение 30 мин добавляли 1-бромгексадекан (150 мл). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, а затем гасили добавлением этанола (EtOH) (50 мл). Реакционную смесь выпаривали в вакууме и остаток суспендировали в метилхлориде и очищали при помощи хроматографии на силикагеле с использованием 5-10% MeOH/CH₂Cl₂ в качестве элюента. Фракции, содержащие продукт, объединяли и растворитель удаляли, получая неочищенную пену 201 (95 г).

Синтез соединения 203. Вышеупомянутую пену (95 г) и аденозиндезаминазу (2000 мг, Sigma Chemicals Type II) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи в 0,1 М трис-буфере (1500 мл, pH 7,4), DMSO (1000 мл) и 0,1 М натрий-фосфатном буфере (100 мл). Добавляли еще аликвоту аденозиндезаминазы (140 мг) в 0,1 М фосфатном буфере (30 мл) и DMSO (20 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 10 дней. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток подвергали флэш-хроматографии на силикагеле с использованием 0-10% MeOH/CH₂Cl₂. Фракции, содержащие продукт, выпаривали в вакууме с получением твердого вещества 203 (35 г).

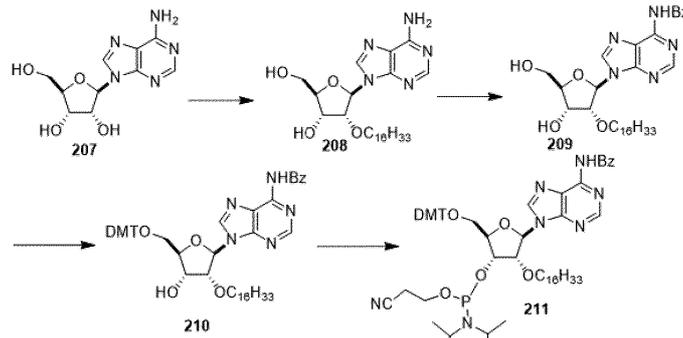
Синтез соединения 204. Вышеуказанное твердое вещество (35 г) в пиридине (500 мл) охлаждали на ледяной бане и добавляли триметилсилилхлорид (84 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин и добавляли изо-бутирилхлорид (58 мл). Раствор перемешивали в течение 4 ч до достижения комнатной температуры. Раствор охлаждали, добавляли H₂O (100 мл) и раствор перемешивали в течение дополнительных 30 мин. Добавляли концентрированный NH₄-OH (100 мл) и раствор выпаривали в вакууме. Остаток очищали при помощи хроматографии на силикагеле с использованием 0-5% MeOH/DCM для элюирования продукта. Фракции, содержащие продукт, выпаривали с получением 25 г продукта в виде пены 204.

Синтез соединения 205. N2-Изобутирил-2'-О-гексадецилгуанозин 204 (25 г) выпаривали совместно с пиридином, а затем растворяли в пиридине (180 мл). Диметокситритилхлорид (20 г) и диметиламинопиридин (50 мг) добавляли при перемешивании при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и выпаривали в вакууме. Остаток распределяли между CH₂Cl₂/водным NaHCO₃. Органическую фазу сушили (MgSO₄) и выпаривали. Остаток очищали при помощи хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, 1:1) с получением 30 г продукта 205.

Синтез соединения 206. Вышеупомянутое твердое вещество 205 (30 г), бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфит (20 г) и N,N-диизопропиламмония тетразолид (10 г) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор разделяли относительно водного NaHCO₃ и высушивали над MgSO₄. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (1% TEA в EtOAc) с получением 29 г продукта 206 в виде пены. ¹H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 7,84 (d, J=11,1 Гц, 1H), 7,45 (dd, J=7,7, 5,7 Гц, 2H), 7,33 (dd, J=9,0, 7,1 Гц, 4H), 7,27 (m, 2H), 7,22 (dd, J=8,5, 6,0 Гц, 1H), 6,83 (m, 4H), 5,89 (t, J=5,7 Гц, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,47 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 3,92-3,77 (m, 1H), 3,75 (d, J=2,3 Гц, 6H), 3,72-3,66 (m, 1H), 3,62 (m, 3H), 3,49 (m, 1H), 3,37 (d, J=3,9 Гц, 1H), 3,33 (d, J=4,0 Гц, 1H), 2,67 (d, J=3,9 Гц, 1H), 2,58-2,41 (m, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,34-1,14 (m, 35H),

1,14-1,02 (m, 9H), 0,88 (t, J=6,7 Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,11, 150,93.

Схема 2



Синтез соединения 208. Гидрид натрия (NaH) (25 г) добавляли к 2,6-диамино-9-(β-О-рибофуранозил)пурину 207 (125 г) в сухом диметилформамиде (DMF) (1500 мл). После перемешивания в течение 30 мин добавляли 1-бромгексадекан (180 мл). Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, а затем гасили добавлением этанола (EtOH) (50 мл). Реакционную смесь выпаривали в вакууме и остаток суспендировали в метилхлориде и очищали при помощи хроматографии на силикагеле с использованием 0-10% MeOH/CH₂Cl₂ в качестве элюента. Фракции, содержащие продукт, объединяли и растворитель удаляли с получением продукта 208 в виде пены (36 г).

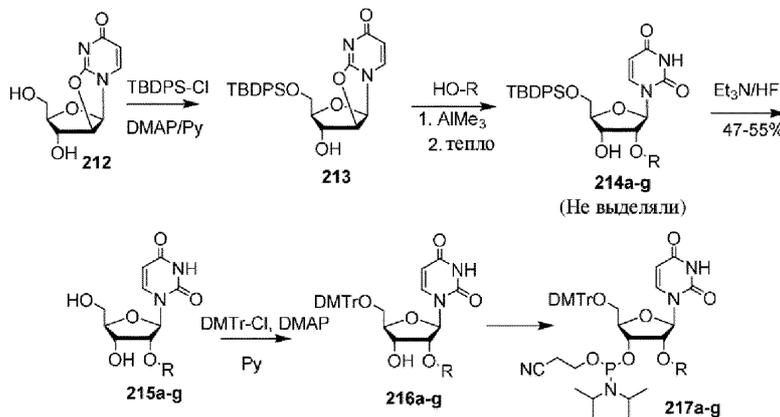
Синтез соединения 209. Вышеуказанное твердое вещество 208 (36 г) в пиридине (500 мл) охлаждали на ледяной бане и добавляли триметилсилилхлорид (30 мл).

Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин и добавляли бензоилхлорид (20 мл). Раствор перемешивали в течение 4 ч до достижения комнатной температуры. Раствор охлаждали, добавляли H₂O (100 мл) и раствор перемешивали в течение дополнительных 30 мин. Добавляли концентрированный NH₄-OH (100 мл) и раствор выпаривали в вакууме. Остаток очищали спомощью хроматографии на силикагеле с использованием 0-5% MeOH/CH₂Cl₂ для элюирования продукта. Фракции, содержащие продукт, выпаривали с получением 32 г продукта 209 в виде пены.

Синтез соединения 210. N2-Бензоил-2'-О-гексадециладенозин 209 (32 г) выпаривали совместно с пиридином, а затем растворяли в пиридине (180 мл). Диметокситриэтилхлорид (20 г) и диметиламинопиридин (50 мг) добавляли при перемешивании при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи и выпаривали в вакууме. Остаток распределяли между DCM/водным NaHCO₃. Органическую фазу сушили (MgSO₄) и выпаривали. Остаток очищали при помощи хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, 1:1) с получением 35 г продукта 210.

Синтез соединения 211. Вышеупомянутое твердое вещество 210 (35 г), бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфит (20 г) и N,N-диизопропиламмония тетразолид (10 г) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор разделяли относительно водного NaHCO₃ и высушивали над MgSO₄. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток очищали при помощи хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, 1:1) с получением 37 г продукта 211 в виде пены. ^1H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,37 (s, 1H), 8,57 (d, J=9,4 Гц, 1H), 8,27 (d, J=10,3 Гц, 1H), 7,99 (d, J=7,6 Гц, 2H), 7,61 (d, J=7,4 Гц, 1H), 7,52 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,42 (t, J=7,3 Гц, 2H), 7,34-7,16 (m, 7H), 6,85-6,77 (m, 4H), 6,11 (dd, J=5,0, 2,5 Гц, 1H), 4,80 (m, 1H), 4,69 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 3,97-3,78 (m, 1H), 3,74 (d, J=3,1 Гц, 7H), 3,64 (m, 4H), 3,56-3,40 (m, 2H), 3,33 (m, 1H), 2,73-2,59 (m, 1H), 2,50 (t, J=6,0 Гц, 1H), 1,52-1,45 (m, 2H), 1,33-1,12 (m, 37H), 1,09 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,19, 150,78.

Схема 3



R = C₆H₁₃, C₈H₁₇, C₁₀H₂₁, C₁₂H₂₅, C₁₄H₂₉, C₁₆H₃₃ и C₁₈H₃₅

Синтез соединения 213. К раствору ангидросоединения 212 (24,0 г, 0,1 моль) и DMAP (0,16 г, 1,3 ммоль) в безводном пиридине (120 мл) в атмосфере аргона добавляли TBDPSCI (28 мл, 0,11 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч, после чего с помощью TLC (хлороформ:метанол, 5:1) не наблюдали заметного количества исходного материала 212. Пиридин удаляли при пониженном давлении и остаток распределяли между этилацетатом и 10% фосфорной кислотой. Органическую фазу отделяли, промывали последовательно 5% водным NaCl и насыщенным NaCl и высушивали над безводным сульфатом натрия. После того, как кристаллизация началась во время промывки водой, добавляли ограниченное количество DCM для растворения твердых веществ. После фильтрации с сульфатом натрия раствор выпаривали и остаток перемешивали с 800 мл диэтилового эфира в течение 2 дней. Белый осадок отфильтровали, промывали один раз диэтиловым эфиром и высушивали с получением 40,8 г (85%) 213 в виде белого кристаллического твердого вещества.

Синтез соединений 215f и 215g. 0,36 моль гексадекан-1-ола или олеилового спирта сушили в высоком вакууме в течение ~ 40 мин в круглодонной колбе, снабженной магнитным стержнем, впуском газа, обратным холодильником, масляной нагревательной баней, капельной воронкой и барботером наверху конденсатора с наполненной Ag колбой. Добавляли безводный диглим (65 мл) с последующим добавлением по каплям 2M раствора AlMe₃ в гептане (55 мл, 0,11 ммоль). Смесь нагревали до 110°C и завершение реакции отслеживали по окончанию выделения метана. Смесь охлаждали до комнатной температуры в атмосфере Ag, затем добавляли ангидронуклеозид 213 (23,2 г, 50 ммоль) и масляную баню нагревали при 145°C в течение ночи. Смесь охлаждали до комнатной температуры в атмосфере Ag и распределяли между 10% H₃PO₄ (500 мл) и этилацетатом (250 мл). Органический слой отделяли, промывали последовательно водным NaCl (5%) и насыщенным NaCl и высушивали над безводным Na₂SO₄. Растворители удаляли в вакууме, остаток растворяли в THF (200 мл) и обрабатывали триэтиламинтригидрофторидом (33 мл, 0,2 моль). Смесь перемешивали в атмосфере Ag в течение 3 дней и распределяли между 5% водным NaCl (300 мл) и этилацетатом (300 мл). Органическую фазу отделяли, промывали насыщенным водным NaCl и растворитель выпаривали. Остаток растворяли в гексанах (800 мл) и экстрагировали 90% водным MeOH (2×800 мл). Объединенные метанольные экстракты выпаривали и остаток распределяли между этилацетатом и насыщенным водным NaCl. Органическую фазу отделяли и высушивали над безводным Na₂SO₄. Растворитель выпаривали и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с градиентом 3-10% метанола в DCM с получением 10,9 г (47%) 215f (R=C₁₆H₃₃) или 13,7 г (55%) 215g (R=C₁₈H₃₅, олеил).

Синтез соединения 216f. К раствору ангидросоединения 215f (10,61 г, 22,6 ммоль), DMAP (550 г, 4,4 ммоль) и DMTrCl (9,76 г, 29 ммоль) в безводном пиридине (70 мл) в атмосфере аргона добавляли триэтиламин (4,1 мл, 29 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, гасили путем добавления 1 мл MeOH.

Пиридин удаляли в вакууме, а остаток распределяли между этилацетатом и 5% водным NaCl. Органическую фазу отделяли, промывали насыщенным NaCl и высушивали над безводным сульфатом натрия. Растворитель выпаривали в вакууме и продукт выделяли с помощью хроматографии остатка на колонке с силикагелем с градиентом (от 35 до 60%) этилацетата в гексанах с получением 14,89 г (86%) 216f в виде желтоватой аморфной пены.

Синтез соединения 217f. Соединение 216f (25 г), бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфит (15 г) и N,N-диизопропиламмония тетразолид (7,5 г) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор разделяли относительно водного NaHCO₃ и высушивали над MgSO₄. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, 1:1) с получением 27 г продукта в виде пены. ¹H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,02 (s, 1H), 7,77 (dd, J=43,4, 8,1 Гц, 1H), 7,49-7,40 (m, 2H), 7,36-7,29 (m, 6H), 7,26 (m, 1H), 6,88 (dd, J=8,7, 6,4 Гц, 4H), 5,85 (dd, J=7,5, 3,4 Гц, 1H), 5,22 (t, J=7,6 Гц, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,14 (m, 1H), 4,07-3,99 (m, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,77 (d, J=3,1 Гц, 7H), 3,63 (m, 5H), 3,45-3,33 (m, 2H), 2,66 (m, 1H), 2,52 (d, J=5,9 Гц, 1H), 1,55 (m, 2H), 1,26 (s, 26H), 1,16 (dd, J=11,0, 6,7 Гц, 9H), 1,05 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,88 (t, J=6,8 Гц, 3H). ³¹P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,01, 150,61.

Синтез соединения 216a. Соединение 216a синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,37 (d, J=2,3 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,39-7,34 (m, 2H), 7,31 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,28-7,20 (m, 5H), 6,94-6,83 (m, 4H), 5,28 (dd, J=8,1, 2,2 Гц, 1H), 5,11 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,16 (m, 1H), 4,01-3,92 (m, 1H), 3,89 (t, J=4,6 Гц, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,30-3,18 (m, 2H), 1,54-1,43 (m, 2H), 1,33-1,15 (m, 6H), 0,83 (t, J=6,7 Гц, 3H).

Синтез соединения 217a. Соединение 216a (4,0 г, 6,35 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,21 мл, 12,7 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,12 мл, 9,53 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический

слой отделяли и промывали соевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (3,42 г, 65%) 216a. ^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 8,98 (s, 1H), 7,86-7,66 (m, 1H), 7,49-7,39 (m, 2H), 7,39-7,21 (m, 7H), 6,93-6,83 (m, 4H), 5,85 (dd, J=6,2, 3,5 Гц, 1H), 5,22 (dd, J=8,2, 6,3 Гц, 1H), 4,44 (m, 1H), 4,20-3,98 (m, 2H), 3,93-3,82 (m, 1H), 3,77 (d, J=2,4 Гц, 7H), 3,71-3,55 (m, 5H), 3,47-3,32 (m, 2H), 2,72-2,61 (m, 1H), 2,52 (t, J=6,0 Гц, 1H), 1,62-1,49 (m, 2H), 1,41-1,23 (m, 6H), 1,17 (dd, J=8,8, 6,8 Гц, 9H), 1,05 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,88 (m, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 149,63, 149,26.

Синтез соединения 216b. Соединение 216b синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,36 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,41-7,35 (m, 2H), 7,31 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,23 (m, 5H), 6,94-6,82 (m, 4H), 5,79 (d, J=3,9 Гц, 1H), 5,28 (dd, J=8,1, 2,2 Гц, 1H), 5,11 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,99-3,92 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,30-3,17 (m, 2H), 1,49 (t, J=6,9 Гц, 2H), 1,30-1,19 (m, 10H), 0,89-0,79 (m, 3H).

Синтез соединения 217b. Соединение 216b (4,0 г, 6,08 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,12 мл, 12,16 ммоль). Добавляли 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,03 мл, 9,12 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (3,55 г, 68%) 217b. ^1H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,12 (d, J=4,5 Гц, 1H), 7,85-7,68 (m, 1H), 7,44 (m, 2H), 7,37-7,28 (m, 6H), 7,26 (m, 1H), 6,93-6,83 (m, 4H), 5,88-5,80 (m, 1H), 5,29-5,20 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,09-4,01 (m, 1H), 3,99-3,82 (m, 1H), 3,83-3,71 (m, 8H), 3,73-3,55 (m, 5H), 3,46-3,33 (m, 2H), 2,66 (m, 1H), 2,52 (t, J=6,0 Гц, 1H), 1,97 (s, 1H), 1,56 (m, 2H), 1,39-1,24 (m, 10H), 1,24-1,10 (m, 9H), 1,06 (d, J=6,7 Гц, 3H), 0,91-0,84 (m, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 149,64, 149,25.

Синтез соединения 216c. Соединение 216c синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,36 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,41-7,35 (m, 2H), 7,31 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,27-7,19 (m, 5H), 6,92-6,86 (m, 4H), 5,79 (d, J=3,9 Гц, 1H), 5,28 (dd, J=8,1, 2,1 Гц, 1H), 5,11 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,30-3,18 (m, 2H), 1,49 (t, J=6,9 Гц, 2H), 1,23 (d, J=7,0 Гц, 13H), 0,83 (t, J=6,6 Гц, 3H).

Синтез соединения 217c. Соединение 216c (4,0 г, 5,83 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,04 мл, 11,66 ммоль). Добавляли 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (1,95 мл, 8,75 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,20 г, 81%) 217c. ^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,02 (s, 1H), 7,77 (dd, J=35,4, 8,2 Гц, 1H), 7,49-7,39 (m, 2H), 7,39-7,21 (m, 7H), 6,93-6,83 (m, 4H), 5,85 (dd, J=6,1, 3,5 Гц, 1H), 5,22 (dd, J=8,2, 6,3 Гц, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,77 (d, J=2,4 Гц, 7H), 3,69-3,53 (m, 4H), 3,47-3,32 (m, 2H), 2,71-2,61 (m, 1H), 2,52 (t, J=6,0 Гц, 1H), 1,56 (m, 2H), 1,38-1,24 (m, 14H), 1,16 (dd, J=8,8, 6,8 Гц, 9H), 1,05 (d, J=6,7 Гц, 3H), 0,92-0,83 (m, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 149,63, 149,25.

Синтез соединения 216d. Соединение 216d синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,36 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,41-7,34 (m, 2H), 7,31 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,28-7,19 (m, 5H), 6,94-6,81 (m, 4H), 5,79 (d, J=3,9 Гц, 1H), 5,28 (dd, J=8,1, 2,2 Гц, 1H), 5,11 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,73 (s, 7H), 3,55 (m, 2H), 3,30-3,17 (m, 2H), 1,49 (t, J=6,8 Гц, 2H), 1,22 (s, 19H), 0,88-0,79 (m, 3H).

Синтез соединения 217d. Соединение 216d (5,0 г, 6,99 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,44 мл, 14 ммоль). Добавляли 2-цианэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,34 мл, 10,50 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную

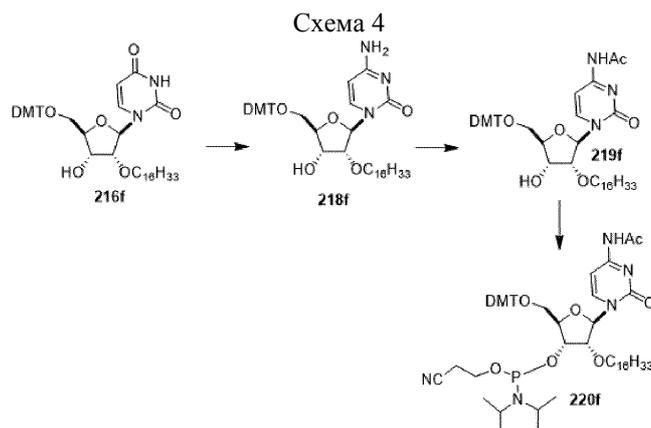
смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,54 г, 73%) 217d. ^1H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 8,15 (s, 1H), 8,01 (dd, J=44,6, 8,2 Гц, 1H), 7,43-7,34 (m, 2H), 7,34-7,21 (m, 7H), 6,84 (m, 3H), 5,95 (dd, J=21,0, 2,6 Гц, 1H), 5,21 (t, J=7,5 Гц, 1H), 4,29-4,17 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,97-3,86 (m, 1H), 3,80 (d, J=3,5 Гц, 6H), 3,77-3,64 (m, 2H), 3,65-3,52 (m, 4H), 3,44 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,42 (t, J=6,3 Гц, 1H), 1,60 (dd, J=7,2, 4,5 Гц, 2H), 1,39-1,21 (m, 17H), 1,21-1,12 (m, 8H), 1,04 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 2H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, хлороформ-d) δ 150,102, 150,07.

Синтез соединения 216e. Соединение 216e синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,36 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,37 (d, J=7,3 Гц, 2H), 7,31 (t, J=7,5 Гц, 2H), 7,27-7,20 (m, 5H), 6,93-6,82 (m, 4H), 5,79 (d, J=3,8 Гц, 1H), 5,27 (dd, J=8,1, 2,1 Гц, 1H), 5,11 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,89 (m, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,30-3,18 (m, 2H), 1,49 (t, J=6,9 Гц, 2H), 1,21 (s, 22H), 0,83 (t, J=6,6 Гц, 3H).

Синтез соединения 217e. Соединение 216e (5,0 г, 6,73 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,35 мл, 13,46 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,25 мл, 10,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,86 г, 77%) 217e. ^1H ЯМР (500 МГц, хлороформ-d) δ 8,49 (s, 1H), 8,01 (dd, J=45,8, 8,2 Гц, 1H), 7,39 (dd, J=17,7, 7,3 Гц, 2H), 7,34-7,21 (m, 8H), 6,88-6,79 (m, 4H), 5,96 (dd, J=21,6, 2,5 Гц, 1H), 5,22 (dd, J=8,2, 6,2 Гц, 1H), 4,29-4,17 (m, 1H), 4,04-3,87 (m, 2H), 3,80 (dd, J=3,6, 1,4 Гц, 8H), 3,76-3,64 (m, 2H), 3,64-3,53 (m, 5H), 3,45 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,42 (s, 1H), 1,59 (m, 3H), 1,40-1,29 (m, 4H), 1,25 (s, 21H), 1,22-1,10 (m, 11H), 1,04 (d, J=6,8 Гц, 4H), 0,88 (t, J=6,9 Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, хлороформ-d) δ 150,13, 150,06.

Синтез соединения 216g. Соединение 216g синтезировали с применением процедуры, описанной для соединения 216f. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,36 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,71 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,40-7,29 (m, 4H), 7,23 (m, 5H), 6,93-6,85 (m, 4H), 5,78 (d, J=3,8 Гц, 1H), 5,35-5,23 (m, 3H), 5,10 (d, J=6,5 Гц, 1H), 4,15 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,88 (t, J=4,5 Гц, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,54 (m, 2H), 3,30-3,16 (m, 2H), 1,96 (m, 4H), 1,49 (t, J=6,8 Гц, 2H), 1,32-1,15 (m, 21H), 0,87-0,79 (m, 3H).

Синтез соединения 217g. Соединение 216g (5,0 г, 6,28 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,19 мл, 12,56 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,09 мл, 9,42 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 70%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 30% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,83 г, 77,1%) 217g. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,38 (s, 1H), 8,02 (dd, J=35,6, 8,1 Гц, 1H), 7,44-7,35 (m, 2H), 7,28 (m, 7H), 6,84 (m, 4H), 5,95 (dd, J=16,6, 2,5 Гц, 1H), 5,34 (t, J=4,9 Гц, 2H), 5,21 (dd, J=8,1, 5,5 Гц, 1H), 4,30-4,17 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 3,80 (d, J=2,5 Гц, 6H), 3,77-3,65 (m, 2H), 3,59 (m, 4H), 3,45 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,42 (s, 1H), 2,00 (m, 4H), 1,59 (m, 3H), 1,30 (dd, J=22,5, 8,3 Гц, 21H), 1,22-1,13 (m, 8H), 1,04 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,88 (t, J=6,7 Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, хлороформ-d) δ 150,12, 150,07.

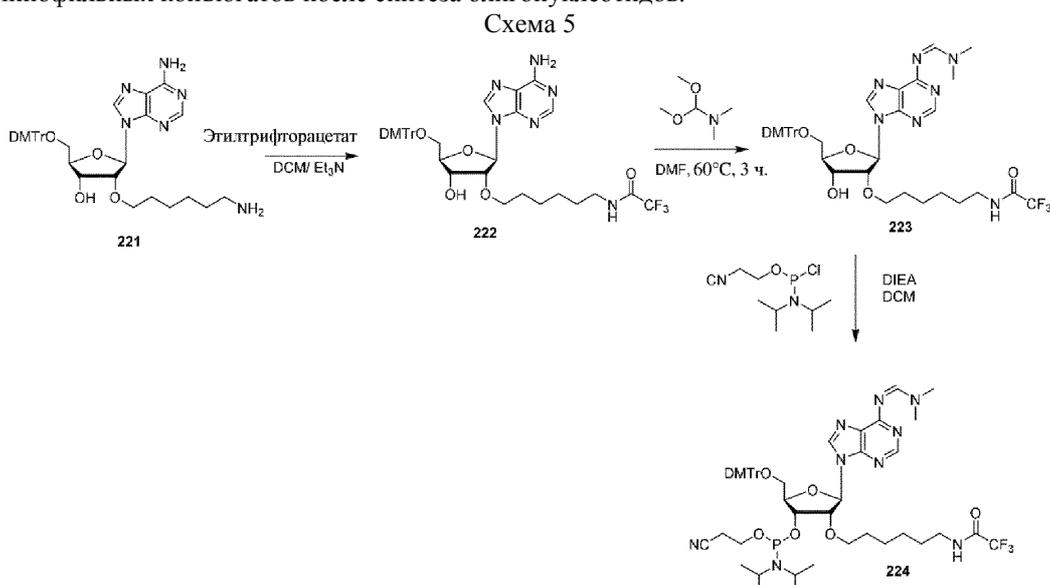


Синтез соединения 218f. Нуклеозид DMT 217f (30 г) растворяли в безводном пиридине (300 мл). Добавляли триметилсилилхлорид (20 мл) и смесь перемешивали в течение 30 мин. Добавляли триазол (30 г) и триэтиламин (80 мл) и охлаждали до 0°C. Добавляли POCl₃ (9 мл) и смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C. Добавляли концентрированный аммиак (100 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Добавляли 500 мл воды и смесь экстрагировали при помощи CH₂Cl₂ (2×500 мл). Объединенный органический слой выпаривали и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле. Желаемый продукт 218f элюировали смесью метанол/CH₂Cl₂ (0-5%). Выход: 24 г.

Синтез соединения 219f. Вышеуказанное твердое вещество 218f (24 г) растворяли в DMF (200 мл) и добавляли уксусный ангидрид (6 мл). Раствор перемешивали в течение 24 ч. Добавляли воду (500 мл) и смесь экстрагировали при помощи дихлорметана (500 мл). Органический слой выпаривали и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле. Желаемый продукт 219f элюировали смесью метанол/CH₂Cl₂ (0-5%). Выход: 21 г.

Синтез соединения 220f. Вышеупомянутое соединение 219f (21 г), бис-(N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтилфосфит (14 г) и N,N-диизопропиламония тетразолид (7 г) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор разделяли относительно водного NaHCO₃ и высушивали над MgSO₄. Растворитель выпаривали в вакууме и остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, 1:1) с получением 22 г продукта в виде пены. ¹H ЯМР (500 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,15 (s, 1H), 8,46 (dd, J=45,6, 7,5 Гц, 1H), 7,95 (d, J=7,6 Гц, 2H), 7,63 (t, J=7,5 Гц, 1H), 7,57-7,41 (m, 5H), 7,41-7,31 (m, 6H), 7,28 (m, 1H), 7,04 (d, J=15,8 Гц, 1H), 6,90 (t, J=7,9 Гц, 4H), 5,90 (d, J=7,8 Гц, 1H), 4,51 (m, 1H), 4,20 (dd, J=10,6, 8,1 Гц, 1H), 4,04 (dd, J=31,3, 4,6 Гц, 1H), 3,91-3,81 (m, 2H), 3,79 (d, J=3,1 Гц, 6H), 3,74 (m, 2H), 3,69-3,41 (m, 6H), 2,67-2,59 (m, 1H), 2,54-2,48 (m, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,25 (d, J=4,7 Гц, 26H), 1,21-1,09 (m, 10H), 1,04 (d, J=6,8 Гц, 3H), 0,87 (t, J=6,8 Гц, 3H). ³¹P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,10, 150,19.

Пример 2. Синтез нуклеозидфосфорамидитов, применяемых в качестве предшественников для введения липофильных конъюгатов после синтеза олигонуклеотидов.



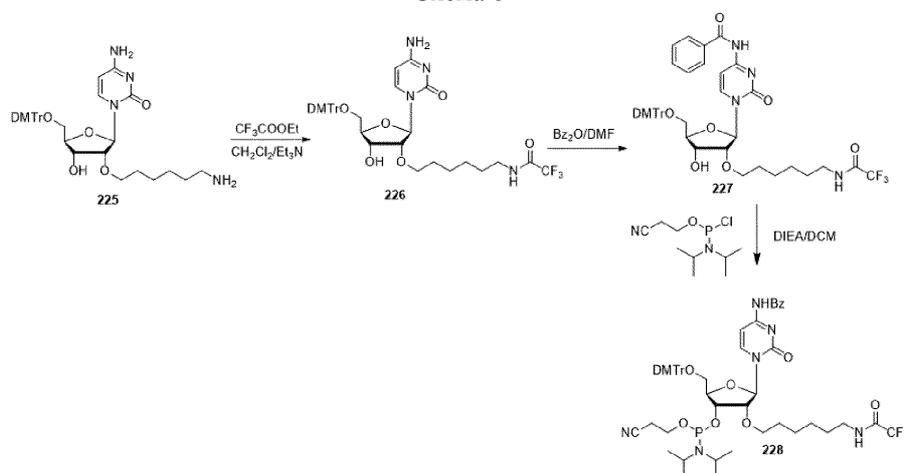
Соединение 222. Соединение 221 (6 г, 8,98 ммоль) добавляли в реакционную колбу и растворяли в DCM. Реакционную смесь перемешивали и с помощью шприца добавляли триметиламин (4,89 мл, 35,92 ммоль). К реакционной смеси по каплям добавляли этилтрифторацетат (3,19 г, 22,45 ммоль). Реакцию

проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 5%), проявленной с использованием фосфорномолибденовой кислоты, и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали и помещали в высокий вакуум с получением (4,96 г 72%) 222. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,36 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,41-7,33 (m, 2H), 7,31 (s, 2H), 7,24 (m, 6,8 Гц, 7H), 6,88-6,79 (m, 4H), 6,01 (d, J=5,0 Гц, 1H), 5,18 (d, J=6,0 Гц, 1H), 4,57 (t, J=5,0 Гц, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,07 (m, 1H), 3,73 (s, 6H), 3,58 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,24 (d, J=4,7 Гц, 2H), 3,12 (m, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,18 (d, J=5,5 Гц, 4H). Расчет массы для C₃₉H₄₃F₃N₆O₇: 764,80, найденное значение: 765,3 (M+H).

Соединение 223. Соединение 222 (4,96 г, 6,49 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Исходный материал растворяли в диметилформамиде и через шприц добавляли диметилацеталь N,N-диметилформамида (4,31 мл, 32,45 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 60°C на масляной бане в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 5%), реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (MeOH/DCM, от 0% до 10%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (5,21 г, 98%) 223. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,35 (t, J=5,5 Гц, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,37 (d, J=4,8 Гц, 2H), 7,41-7,33 (m, 2H), 7,31-7,16 (m, 7H), 6,89-6,78 (m, 4H), 6,07 (d, J=5,1 Гц, 1H), 5,20 (d, J=6,0 Гц, 1H), 4,61 (t, J=5,1 Гц, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,09 (m, 1H), 3,73 (d, J=1,3 Гц, 6H), 3,58 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,25 (d, J=4,7 Гц, 2H), 3,20 (s, 3H), 3,13 (s, 3H), 3,10 (m, 2H), 1,41 (m, 4H), 1,17 (m, 4H). Расчет массы для C₄₂H₄₈F₃N₇O₇: 819,88, найденное значение: 820,4 (M+H).

Соединение 224. Соединение 223 (5,21 г, 6,36 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,21 мл, 12,72 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (2,12 мл, 9,54 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc, 100%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 10% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (5,02 г, 77%) 224. ^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 8,89 (d, J=1,9 Гц, 1H), 8,35 (d, J=8,3 Гц, 1H), 8,10 (d, J=9,2 Гц, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,34-7,15 (m, 7H), 6,81 (m, 4H), 6,09-6,01 (m, 1H), 4,83-4,62 (m, 2H), 4,28 (m, J=16,1, 4,2 Гц, 1H), 4,15-3,98 (m, 1H), 3,94-3,77 (m, 2H), 3,75 (d, J=2,6 Гц, 6H), 3,69-3,55 (m, 4H), 3,55-3,37 (m, 3H), 3,30 (m, 1H), 3,16 (d, J=9,9 Гц, 7H), 2,75 (t, J=6,0 Гц, 1H), 2,72-2,63 (m, 1H), 2,50 (s, 1H), 1,47 (m, 2H), 1,38 (s, 1H), 1,27-1,11 (m, 19H), 1,08 (d, J=6,7 Гц, 4H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,08, 150,72 ^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетонитрил-d₃) δ -77,04 (d, J=2,7 Гц).

Схема 6



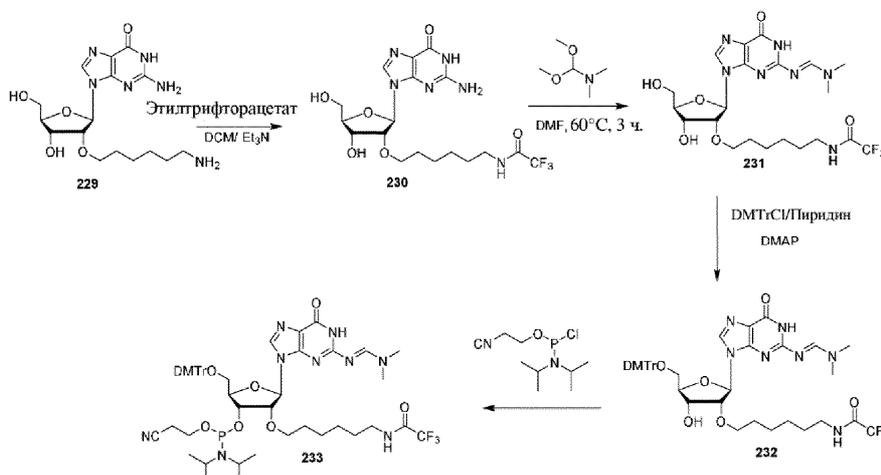
Соединение 226. Соединение 225 (6 г, 9,31 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли триметиламин (5,08 мл, 37,24 ммоль). К реакционной смеси по каплям добавляли этилтрифторацетат (3,31 г, 23,28 ммоль). Реакцию проверяли с помощью TLC (этилацетат, 100%), проявляли с использованием фосфорномолибденовой кислоты, и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбона-

та натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 10% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,22 г, 61,2%) 226. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,40 (t, J=5,5 Гц, 1H), 7,79 (d, J=7,5 Гц, 1H), 7,43-7,37 (m, 2H), 7,33 (t, J=7,5 Гц, 2H), 7,30-7,23 (m, 5H), 7,18 (d, J=16,4 Гц, 2H), 6,95-6,86 (m, 4H), 5,82 (d, J=2,6 Гц, 1H), 5,50 (d, J=7,5 Гц, 1H), 5,01 (d, J=7,0 Гц, 1H), 4,17 (m, 1H), 3,96 (dd, J=7,2, 3,4 Гц, 1H), 3,75 (s, 6H), 3,73 (dd, J=5,0, 2,6 Гц, 1H), 3,62 (m, 2H), 3,27 (d, J=3,4 Гц, 2H), 3,17 (m, 2H), 1,50 (m, 4H), 1,29 (m, 4H). Расчет массы для C₃₈H₄₃F₃N₄O₈: 740,78, найденное значение: 739,2 (М-Н).

Соединение 227. Соединение 226 (4,22 г, 5,7 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Исходный материал растворяли в диметилформамиде и добавляли бензойный ангидрид (1,42 г, 6,27 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 5%), проявляли с использованием фосфорномолибденовой кислоты и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (MeOH/DCM, от 0% до 10%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (3,41 г, 71%) 227. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,29 (s, 1H), 9,40 (t, J=5,4 Гц, 1H), 8,41 (d, J=7,5 Гц, 1H), 8,04-7,93 (m, 2H), 7,68-7,59 (m, 1H), 7,52 (dd, J=8,3, 7,0 Гц, 2H), 7,45-7,39 (m, 2H), 7,35 (t, J=7,7 Гц, 2H), 7,29 (dd, J=7,8, 5,4 Гц, 5H), 7,16 (d, J=7,5 Гц, 1H), 6,98-6,89 (m, 4H), 5,84 (d, J=1,4 Гц, 1H), 5,11 (d, J=7,3 Гц, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,06 (m, 1H), 3,89-3,82 (m, 1H), 3,77 (s, 7H), 3,72-3,61 (m, 1H), 3,38 (m, 2H), 3,18 (m, 2H), 1,53 (m, 4H), 1,33 (m, 4H). Расчет массы для C₄₅H₄₇F₃N₄O₉: 844,89, найденное значение: 843,3 (М-Н).

Соединение 228. Соединение 227 (3,41 г, 4,04 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (1,4 мл, 8,08 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (1,35 мл, 6,06 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 2/1) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество затем отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 10% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (3,81 г, 90,3%) 228. ^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,15 (s, 1H), 8,48 (dd, J=35,8, 7,5 Гц, 1H), 7,98-7,90 (m, 2H), 7,62 (m, 2H), 7,56-7,42 (m, 5H), 7,41-7,23 (m, 8H), 7,04 (s, 1H), 6,94-6,85 (m, 4H), 5,90 (dd, J=6,4, 1,2 Гц, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,24-3,97 (m, 4H), 3,92-3,81 (m, 2H), 3,81-3,77 (m, 6H), 3,77-3,66 (m, 3H), 3,66-3,41 (m, 6H), 3,25 (m, 2H), 2,75 (t, J=5,9 Гц, 1H), 2,64 (m, 1H), 2,56 (s, 1H), 2,50 (d, J=1,8 Гц, 0H), 2,16 (s, 2H), 1,97 (s, 0H), 1,56 (m, 5H), 1,37 (m, 5H), 1,29-1,09 (m, 16H), 1,03 (d, J=6,8 Гц, 4H). ^{31}P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 151,16, 150,18. ^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетонитрил-d₃) δ -77,04 (d, J=2,7 Гц).

Схема 7



Соединение 230. Соединение 229 (2,5 г, 6,54 ммоль) добавляли в реакционную колбу, растворяли в минимальном количестве воды и разбавляли метанолом. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и через шприц добавляли триметиламин (14,27 мл, 104,64 ммоль). Добавляли этилтрифтоацетат (9,3 г,

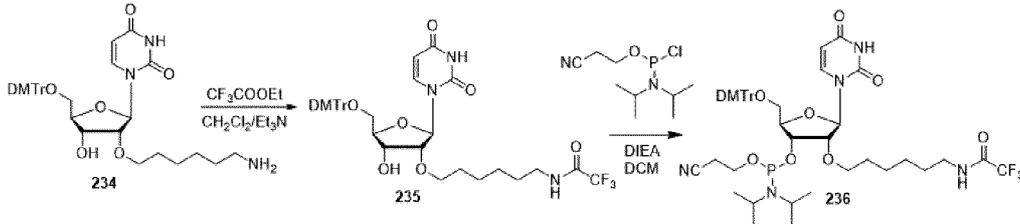
65,4 ммоль), pH контролировали и доводили до ~ pH 9 и реакционную смесь перемешивали в течение 3 дней. Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 15%), проявляли с использованием красителя Nesslerian и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью препаративной HPLC с обращенной фазой с применением способа с ACN/H₂O от 5% до 35% в течение 45 мин. Продукт элюировали около 25 мин. Фракции продукта объединяли, концентрировали при пониженном давлении и лиофилизировали с получением (0,661 г, 21,1%) 230. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10,64 (s, 1H), 9,36 (t, J=5,8 Гц, 1H), 7,96 (s, 1H), 6,45 (s, 2H), 5,77 (d, J=6,4 Гц, 1H), 5,14-5,04 (m, 2H), 4,23 (m, 2H), 3,88 (m, 1H), 3,53 (m, 2H), 3,34 (m, 3H), 3,10 (m, 2H), 1,39 (m, 4H), 1,16 (m, 4H). Расчет массы для C₁₈H₂₅F₃N₆O₆: 478,43, найденное значение: 479,2 (M+H).

Соединение 231. Соединение 230 (0,65 г, 1,36 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Исходный материал растворяли в диметилформамиде и с помощью шприца добавляли диметилацеталь N,N-диметилформамида (0,903 мл, 6,8 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 60°C на масляной бане в течение 2,5 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 7%), реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и высушивали в высоком вакууме в течение ночи. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (MeOH/DCM, от 0% до 10%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (0,504 г, 69,5%) 231. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,37 (s, 1H), 9,36 (t, J=5,8 Гц, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 5,87 (d, J=6,1 Гц, 1H), 5,15 (d, J=5,0 Гц, 1H), 5,07 (t, J=5,5 Гц, 1H), 4,35-4,20 (m, 2H), 3,91 (m, 1H), 3,68-3,49 (m, 3H), 3,37 (m, 1H), 3,14 (s, 3H), 3,10 (m, 2H), 3,02 (s, 3H), 1,39 (m, 4H), 1,16 (dd, J=8,7, 5,0 Гц, 4H). Расчет массы для C₂₁H₃₀F₃N₇O₆: 533,51, найденное значение: 534,3 (M+H).

Соединение 232. В реакционную колбу добавляли соединение 231 (0,5 г, 0,938 ммоль) и 5 мл безводного пиридина. Пиридин отгоняли при пониженном давлении. Это повторяли три раза и реакционную смесь высушивали в высоком вакууме в течение ночи. На следующий день в реакционную колбу добавляли 4-(диметиламино)пиридин (0,011 г, 0,094 ммоль) и безводный пиридин. Реакционную смесь охлаждали до 0°C на ледяной бане. Реакционную колбу вакуумировали и продували аргоном. 4,4'-Диметокситритилхлорид (0,352 г, 1,04 ммоль) растворяли в безводном пиридине и полученный раствор добавляли через шприц в реакционную колбу. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 5%) и проявляли с помощью красителя Nesslerian. Для гашения реакции добавляли метанол и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным бикарбонатом натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (MeOH/DCM, от 0% до 10%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (0,621 г, 79%) 232. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,40 (s, 1H), 9,37 (t, J=5,7 Гц, 1H), 8,48 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,39-7,31 (m, 2H), 7,30-7,16 (m, 7H), 6,88-6,78 (m, 4H), 5,92 (d, J=5,0 Гц, 1H), 5,19 (d, J=5,7 Гц, 1H), 4,30 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,72 (s, 6H), 3,57 (m, 1H), 3,45 (m, 1H), 3,25 (dd, J=10,5, 6,0 Гц, 1H), 3,17-3,10 (m, 2H), 3,09 (d, J=5,5 Гц, 4H), 3,01 (s, 3H), 1,41 (m, 4H), 1,19 (d, J=6,5 Гц, 3H). Расчет массы для C₄₂H₄₈F₃N₇O₈: 835,88, найденное значение: 836,4 (M+H).

Соединение 233. Соединение 232 (1,20 г, 1,44 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (0,5 мл, 2,88 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил-N,N-диизопропилхлорфосфорамидит (0,385 мл, 1,73 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc, 100%) и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным бикарбонатом натрия. Органический слой отделяли и промывали соевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 10% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (1,21 г, 81,2%) 233. ¹H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 9,36 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,73 (d, J=10,7 Гц, 1H), 7,64 (d, J=13,4 Гц, 1H), 7,47-7,37 (m, 2H), 7,35-7,16 (m, 7H), 6,83 (m, 4H), 5,97 (dd, J=5,4, 2,5 Гц, 1H), 4,61-4,44 (m, 2H), 4,30-4,18 (m, 1H), 4,15-3,98 (m, 2H), 3,76 (d, J=3,2 Гц, 6H), 3,71-3,55 (m, 4H), 3,55-3,41 (m, 2H), 3,38-3,28 (m, 2H), 3,18 (m, 2H), 3,08-3,01 (m, 5H), 2,75 (t, J=5,9 Гц, 1H), 2,65 (m, 1H), 2,46 (s, 1H), 1,52-1,34 (m, 4H), 1,27-1,11 (m, 18H), 1,03 (d, J=6,8 Гц, 4H). ³¹P ЯМР (202 МГц, ацетонитрил-d₃) δ 150,95. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, ацетонитрил-d₃) δ -77,04.

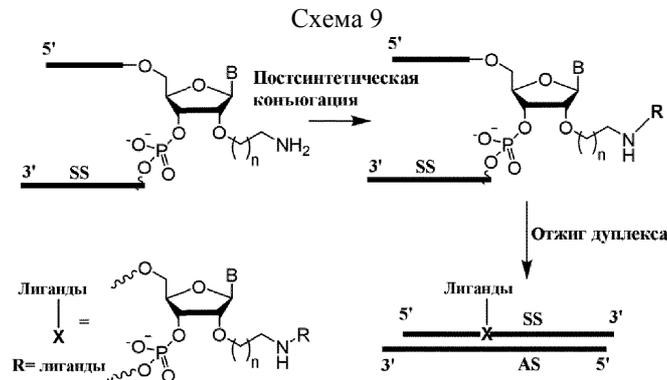
Схема 8

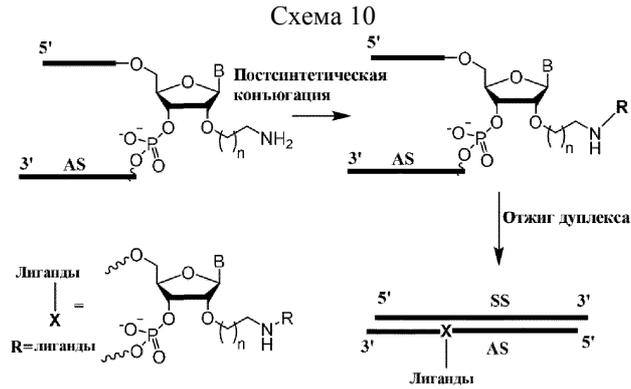


Соединение 235. Соединение 234 (5 г, 7,75 ммоль) добавляли в реакционную колбу. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли триметиламин (4,23 мл, 31 ммоль). К реакционной смеси по каплям добавляли этилтрифторацетат (2,75 г, 19,38 ммоль). Реакцию проверяли с помощью TLC (MeOH/DCM, 5%), проявляли с использованием фосфорномолибденовой кислоты и реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в дихлорметане, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным бикарбонатом натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали, маточный раствор концентрировали и помещали в высокий вакуум с получением (4,32 г 75%) 235. ^1H ЯМР (500 МГц, DMSO- d_6) δ 11,36 (d, $J=2,6$ Гц, 2H), 9,36 (s, 1H), 7,71 (d, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,36 (d, $J=8,4$ Гц, 4H), 7,31 (t, $J=7,6$ Гц, 4H), 7,27-7,20 (m, 10H), 6,89 (d, $J=8,5$ Гц, 8H), 5,78 (d, $J=3,6$ Гц, 2H), 5,27 (dd, $J=8,1$, 2,1 Гц, 2H), 5,10 (dd, $J=6,7$, 2,7 Гц, 2H), 4,16 (m, 2H), 3,95 (m, 2H), 3,88 (m, 2H), 3,73 (s, 13H), 3,55 (m, 4H), 3,36 (m, 1H), 3,28 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 3,22 (dd, $J=10,9$, 2,8 Гц, 2H), 3,14 (m, 3H), 2,11 (s, 2H), 1,48 (m, 8H), 1,36-1,19 (m, 8H). Расчет массы для $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_9$: 741,76, найденное значение: 740,2 (М-Н).

Соединение 236. Соединение 235 (4,3 г, 5,8 ммоль) добавляли в реакционную колбу, вакуумировали и продували аргоном. Исходный материал растворяли в дихлорметане и через шприц добавляли диизопропилэтиламин (2,02 мл, 11,6 ммоль). Добавляли 2-цианоэтил- N,N -диизопропилхлорфосфорамидит (1,93 мл, 8,7 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1-2 ч. Реакцию проверяли с помощью TLC (EtOAc/гексан, 75%) и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате, добавляли в разделительную воронку и органический слой промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Органический слой отделяли и промывали солевым раствором. Затем органический слой отделяли и высушивали с помощью сульфата натрия. Твердое вещество отфильтровывали и маточный раствор концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (EtOAc/гексан, от 10% до 100%) и фракции продукта объединяли и концентрировали при пониженном давлении с получением (4,62 г, 85%) 236. ^1H ЯМР (400 МГц, ацетонитрил- d_3) δ 9,06 (s, 1H), 7,74 (d, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,49-7,39 (m, 2H), 7,39-7,21 (m, 7H), 6,93-6,83 (m, 4H), 5,84 (dd, $J=7,0$, 3,2 Гц, 1H), 5,21 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 4,20-3,97 (m, 3H), 3,91-3,79 (m, 1H), 3,77 (d, $J=2,4$ Гц, 7H), 3,63 (m, 4H), 3,48-3,31 (m, 3H), 3,23 (m, 1H), 2,67 (m, 1H), 2,52 (t, $J=6,0$ Гц, 1H), 2,08 (d, $J=1,9$ Гц, 1H), 1,64-1,45 (m, 4H), 1,42-1,28 (m, 4H), 1,27-1,09 (m, 9H), 1,05 (d, $J=6,7$ Гц, 3H). ^{31}P ЯМР (162 МГц, ацетонитрил- d_3) δ 149,53, 149,06. ^{19}F ЯМР (376 МГц, ацетонитрил- d_3) δ -83,43, -83,89 (d, $J=2,4$ Гц).

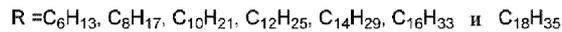
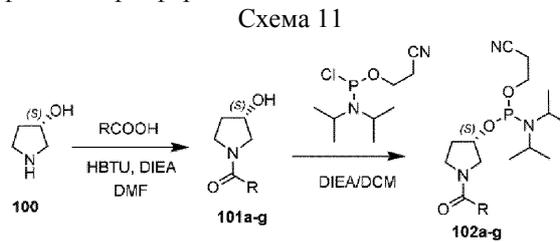
Пример 3. Постсинтетическая конъюгация лигандов (например, липофильных фрагментов) с siRNA.



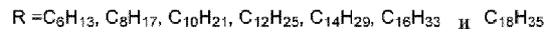
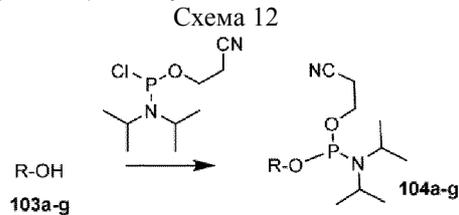


Различные лиганды, в том числе различные липофильные фрагменты, могут быть конъюгированы со средствами на основе siRNA с помощью способов постсинтетической конъюгации, как показано на схемах 9 и 10.

Пример 4. Синтез липофильных фосфорамидитов для 5'-конъюгации.



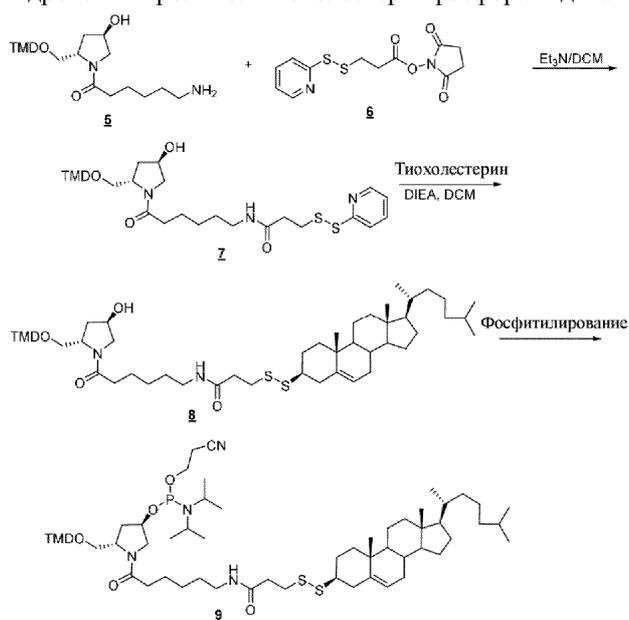
Соединение 101a-g. Соединение 100 (1 г) обрабатывали алкилкарбоновыми кислотами в условиях пептидного связывания. Алкилкарбоновые кислоты помещали в дихлорметан и обрабатывали с помощью HBTU и DIEA в течение нескольких минут. К реакционной смеси добавляли амин и перемешивали в течение 2 ч. Реакцию отслеживали с помощью TLC, реакционную смесь промывали водным раствором бикарбоната и соевым раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия и неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением соединений 101a-g. Фосфорамидиты этих молекул были получены обработкой амидитным реагентом в присутствии DIEA, как показано в примере 1 (схема 4), с получением соединения 102a-g.



Как показано на схеме 12, фосфорамидиты были получены обработкой спирта фосфорамидитным реагентом, как показано в примере 1, с получением соединения 104a-g.

Пример 5. Синтез тиохолестеринамидита и СРГ.

Схема 13. Синтез 4-гидрокси-L-пролинол-тиохолестеринфосфорамидита



N-(6-{2-[бис-(4-Метоксифенил)-фенилметоксиметил]-4-гидрокси-пролидин-1-ил}-6-оксогексил)-3-(пиридин-2-илдисульфанил)-пропионамид (7).

Как показано на схеме 13, амин 5 (7,7 г, 14,5 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (40 мл) и охлаждали до 0°C. К раствору последовательно добавляли триэтиламин (3,0 г, 4,2 мл, 30 ммоль) и сложный 3-(пиридин-2-илдисульфанил)пропионовый сукцинатный эфир 6 (SPDP) (4,5 г, 14,4 ммоль). Температуру реакции доводили до температуры окружающей среды и перемешивали в течение дополнительных 16 ч. Завершение реакции подтверждали с помощью TLC (MeOH/CHCl₃, 10%, R_f=0,6). Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и промывали насыщенным NaHCO₃, водой и затем соевым раствором. Органический слой высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением неочищенного продукта. Соединение 7 (10,58 г, 78%) получали в виде белого пенистого твердого вещества после колоночной хроматографии на силикагеле. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,45 (d, 1H), 7,9 (m, 1H), 7,8 (m, 1H), 7,76 (m, 1H), 7,3 (m, 4H), 7,18 (m, 5H), 6,86 (m, 4H), 4,98 (d, -OH, 1H), 4,38 (m, 1H), 4,1 (m, 1H) (s, 6H), 3,56 (m, 1H), 3,46 (m, 1H), 3,21-3,34 (m, 3H), 3,14 (m, 1H), 3 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,8-2,02 (m, 2H), 1,1-1,5 (4H). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆): δ 171,32, 169,97, 159,36, 158,31, 158,18, 149,80, 145,27, 138,08, 136,1, 135,9, 129,8, 128,0, 127,7, 121,4, 119,3, 113,3, 85,338, 68,7, 55,3, 34,75, 34,28, 29,1, 26,3, 24,36.

4-Гидрокси-L-пролинол-тиохолестерин-DMT-спирт (8).

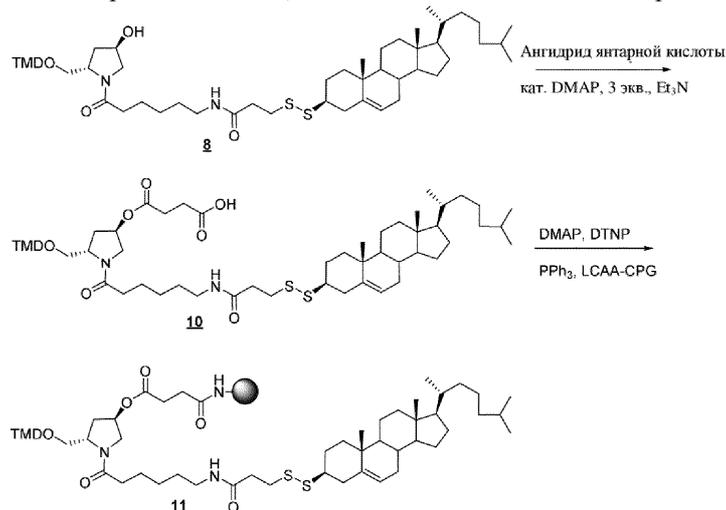
Соединение 7 (7,5 г, 10,28 ммоль) растворяли в безводном дихлорметане (75 мл) в атмосфере аргона и охлаждали до 0°C. К этому раствору добавляли диизопропилэтиламин (2,71 г, 3,66 мл, 21 ммоль) с последующим добавлением тиохолестерина (4,145 г, 10,28 ммоль). Реакционную смесь доводили до температуры окружающей среды и перемешивали в течение дополнительных 16 ч. Завершение реакции подтверждали с помощью TLC (этилацетат, 100%, R_f=0,6). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле. После элюирования с помощью 4 л этилацетата колонку элюировали 5% MeOH/дихлорметан (2 л) с получением соединения 8 в виде белого пенистого твердого вещества (8 г, 76%). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,88 (m, 1H), 7,3 (m, 4H), 7,17 (m, 5H), 6,84 (m, 4H), 5,3 (bs, 1H), 4,89 (d, -OH), 4,38 (m, 1H), 4,1 (m, 1H), 3,72 (s, 6H), 3,56 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 3 (m, 3H), 2,84 (m, 2H), 2,64 (m, 1H), 2,42 (m, 2H), 2,2 (m, 3H), 1,8-2,0 (m, 7H), 0,8-1,54 (m, 35H), 0,62 (s, 3H). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆): δ 170,8, 158,0, 157,9, 155,6, 145,0, 139,7, 135,8, 135,7, 129,5, 127,7, 127,5, 121,7, 113,1, 113,0, 85,7, 85,1, 72,7, 68,5, 63,3, 60,72, 56,1, 55,5, 55,28, 54,9, 49,4, 41,8, 36,5, 35,2, 31,3, 30,35, 27,7, 27,3, 26,0, 24,1, 23,8, 23,2, 22,6, 22,3, 21,11, 20,5, 19,43, 18,9, 18,5, 14,4, 11,6.

4-Гидрокси-L-пролинол-тиохолестерин-фосфорамидит (9).

Соединение 8 (5,7 г, 5,58 ммоль) подвергали совместному выпариванию с безводным толуолом (50 мл). К остатку добавляли N,N-тетраизопропиламмония тетразолид (0,315 г, 2,79 ммоль) и смесь высушивали над P₂O₅ в вакуумной печи в течение ночи при 40°C. Реакционную смесь растворяли в дихлорметане (20 мл) и добавляли 2-цианоэтил-N,N,N',N'-тетраизопропилфосфорамидит (2,48 г, 2,72 мл, 8,25 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. Завершение реакции подтверждали с помощью TLC (R_f=0,9 в этилацетате). Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (50 мл) и промывали 5% NaHCO₃ (50 мл) и соевым раствором (50 мл). Органиче-

ский слой высушивали над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали на силикагеле (EtOAc :гексан:триэтиламин, 50:49:1) с получением **9** в виде белого пенистого твердого вещества (6,1 г, 89%). ^1H ЯМР (400 МГц, C_6D_6): δ 7,62 (m, 2H), 7,45 (m, 5H), 7,24 (m, 2H), 7,1 (m, 1H), 6,82 (m, 4H), 5,64 (m, 1H), 5,38 (m, 1H), 4,7 (m, 1H), 4,54 (m, 2H), 3,78 (m, 2H), 3,5 (m, 3H), 3,36 (m, 9H), 3,22 (m, 4H), 3,06 (m, 3H), 2,72 (m, 1H), 2,32-2,54 (m, 5H), 1,8-2,2 (m, 10H), 1,08-1,74 (m, 28H), 1,3 (m, 6H), 0,94 (m, 12H), 0,67 (s, 3H). ^{31}P ЯМР (161,82 МГц, C_6D_6): δ 146,05, 145,91, 145,66, 145,16. ^{13}C ЯМР (100 МГц, C_6D_6): δ 171,43, 171,25, 169,87, 159,25, 159,11, 146,08, 141,59, 136,66, 136,6, 130,62, 130,54, 128,63, 127,53, 127,02, 121,53, 117,73, 117,57, 113,66, 113,57, 86,59, 86,54, 64,36, 58,56, 58,37, 58,30, 56,96, 56,51, 56,07, 54,86, 54,77, 50,57, 50,27, 43,48, 43,35, 42,55, 40,13, 39,9, 39,75, 39,56, 38,70, 36,94, 36,64, 36,29, 36,19, 35,90, 34,58, 32,24, 32,08, 29,48, 29,03, 28,98, 28,6, 28,38, 26,54, 24,68, 24,61, 24,54, 23,6, 23,0, 22,74, 21,26, 20,03, 19,9, 19,38, 19,01, 12,06.

Схема 14. Синтез полимерной подложки, иммобилизованной тиохолестерином



4-Гидрокси-L-пролинол-тиохолестерин-сукцинат (**10**).

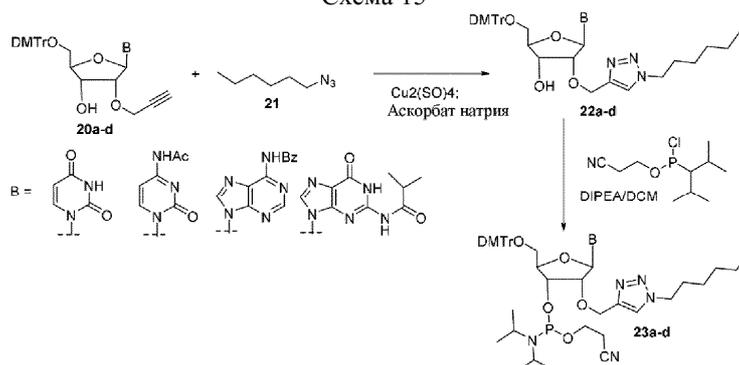
Как показано на схеме 14, соединение **8** (2,2 г, 2,15 ммоль) смешивали с янтарным ангидридом (0,323 г, 3,23 ммоль) и DMAP (0,026 г, 0,215 ммоль) и высушивали в вакууме при 40°C в течение ночи. Смесь растворяли в безводном дихлорметане (10 мл). Затем добавляли триэтиламин (0,708 г, 0,976 мл, 7 ммоль) и раствор перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 16 ч. Затем его разбавляли дихлорметаном (50 мл) и промывали ледяной водной лимонной кислотой (5 мас.% 25 мл) и водой (2×25 мл). Органическую фазу высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали досуха. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии на силикагеле с получением соединения **10** в виде белого пенистого твердого вещества (2,2 г, выход 92%; $R_f=0,6$ с в $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$, 10%). ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 12,22 (bs, 1H), 7,84 (m, 1H), 7,25 (m, 4H), 7,2 (m, 5H), 6,86 (m, 4H), 5,36 (m, 2H), 4,18 (bs, 1H), 3,72 (s, 6H), 3,4-3,6 (m, 2H), 3,2 (m, 1H), 3,0 (m, 4H), 2,84 (m, 2H), 2,64 (m, 2H), 2,4-2,52 (m, 12H), 2,2 (m, 6H), 1,9 (m, 8H), 0,8-1,52 (m, 28H), 0,65 (s, 3H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO-d_6): δ 173,35, 171,94, 170,63, 169,64, 157,99, 144,96, 141,02, 135,72, 129,61, 127,81, 127,55, 113,12, 56,15, 54,99, 52,28, 49,58, 49,06, 41,82, 36,17, 34,97, 33,41, 33,09, 31,32, 27,39, 23,16, 22,68, 22,39, 20,56, 18,95, 18,54, 11,66, 6,02, 5,0.

Твердая подложка с иммобилизованным тиохолестерином (**11**).

Сукцинат **10** (2,1 г, 1,9 ммоль) растворяли в дихлорэтане (8 мл). К этому раствору добавляли DMAP (0,228 г, 1,9 ммоль). Последовательно добавляли 2,2'-дитио-бис(5-нитропиридин) (0,58 г, 1,9 ммоль) в ацетонитриле/дихлорэтане (3:1, 8 мл). К полученному раствору добавляли трифенилфосфин (0,49 г, 1,9 ммоль) в ацетонитриле (4 мл). Реакционная смесь приобретала ярко-оранжевый цвет. Раствор кратковременно перемешивали с помощью ручного встряхивателя (5 мин.). Добавляли длинноцепочечный алкиламин-CPG (LCAA-CPG) (12 г, 1860 мкмоль, 155 мкМ/г). Суспензию перемешивали в течение 4 ч. CPG фильтровали через синтерированную воронку и последовательно промывали ацетонитрилом, дихлорметаном и эфиром. Непрореагировавшие аминогруппы маскировали с помощью уксусного ангидрида/пиридина. Нагрузочная способность CPG **11** измеряли путем измерения УФ-излучения (57 мкМ/г).

Пример 6. Синтез 2'-О-липофильных конъюгатов посредством клик-химии.

Схема 15



Синтез соединения 22a. Коммерчески доступный пропаргил U 20a (5,8 г, 10 ммоль) растворяли в THF (40 мл) и добавляли трет-бутанол (40 мл), а затем сульфат меди (1 г). К этой смеси добавляли водный раствор аскорбата натрия, а затем гексилазид. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. TLC реакции показала завершение на следующий день и реакционную смесь концентрировали в роторном испарителе. Остаток растворяли в дихлорметане (100 мл) и раствор фильтровали через целит, и фильтрат после концентрирования и очистки на колонке давал чистый продукт 22a (6,99 г, 96%) в виде белого твердого вещества.

Синтез соединения 22b. С применением аналогичной процедуры, использованной для U, пропаргил C 20b (6,2 г, 10 ммоль) преобразовывали в соответствующий клик-продукт 22b (5,9 г, 78%) в виде белого твердого вещества.

Синтез соединения 22c. С применением аналогичной процедуры, использованной для U, пропаргил A 20c (7,1 г, 10 ммоль) преобразовывали в соответствующий клик-продукт 22c (7,9 г, 96%) в виде белого твердого вещества.

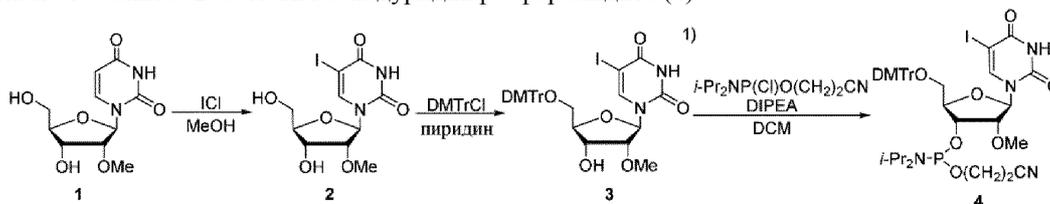
Синтез соединения 22d. С применением аналогичной процедуры, описанной для U, пропаргил G 22d (6,9 г, 10 ммоль) преобразовывали в соответствующий клик-продукт 22d (7,9 г, 96%) в виде грязно-белого порошка.

Синтез фосфорамидитов 23a-d. Соединения 22a-d обрабатывали фосфорамидитным реагентом в присутствии DIEA с получением 23a-d.

Пример 7. Синтез конъюгатов с модифицированными нуклеиновыми основаниями (пиримидинов)

1. Синтез производных 5-йодуридина.

Схема 16. Синтез 2'-О-метил-5-йодуридинфосфорамидита (4)



2'-О-Метил-5-йодуридин (2).

ICl (8,6 мл, 174 ммоль) добавляли к раствору 2'-О-метилуридина 1 (25,0 г, 96,8 ммоль) в MeOH (400 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 15 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. К полученному неочищенному остатку (58,1 г) добавляли DCM (200 мл), затем осадок собирали фильтрацией и промывали с помощью DCM с получением соединения 2 (36,7 г, 99%) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 3,31 (s, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,53-3,59 (m, 1H), 3,67-3,72 (m, 1H), 3,78 (t, J=4,5 Гц, 1H), 3,85 (qu, J=3,0 Гц, 1H), 4,10 (q, J=6,0 Гц, 1H), 5,12 (d, J=6,0 Гц, 1H), 5,30 (t, J=6,0 Гц, 1H), 5,78 (d, J=4,0 Гц, 1H), 8,52 (s, 1H), 11,69 (s, 1H).

5'-О-(4,4'-Диметокситритил)-2'-О-метил-5-йодуридин (3).

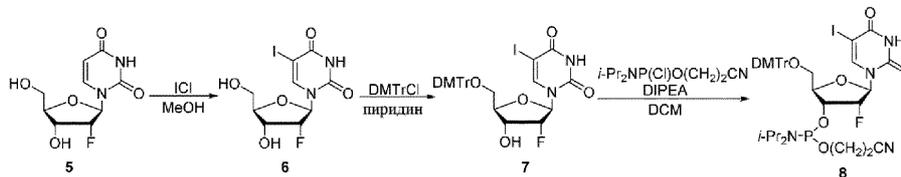
В атмосфере Ar DMTrCl (33,9 г, 100 ммоль) добавляли к раствору соединения 3 (36,6 г, 95,3 ммоль) в безводном пиридине (400 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. Затем реакцию гасили с помощью MeOH и разбавляли с помощью EtOAc. Органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (108 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 0-50%) с получением соединения 3 (53,4 г, 82%) в виде белой пены. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 3,17 (dd, J=3,0, 10,5 Гц, 1H), 3,17 (dd, J=5,0, 10,5 Гц, 1H), 3,39 (s, 3H), 3,73 (s, 6H), 3,91-3,97 (m, 2H), 4,15 (q, J=6,5 Гц, 1H), 5,19 (d, J=6,5 Гц, 1H), 5,78 (d, J=4,0 Гц, 1H), 6,87-7,41 (m, 13H), 7,99 (s, 1H), 11,77 (s, 1H).

3'-О-[2-Цианоэтоксидиизопропиламино]фосфино]-5'-О-(4,4'-диметокситритил)-2'-О-метил-5-йодуридин (4)

В атмосфере Ar добавляли DIPEA (1,2 мл, 7,30 ммоль) и *i*-Pr₂N-P(O)(Cl)O(CH₂)₂CN (0,39 мл,

1,75 ммоль) к раствору соединения 3 (1,00 г, 1,46 ммоль) в безводном DCM (15 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакцию гасили с помощью нас. NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Комбинированный органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (1,46 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 60%) с получением соединения 4 (841 мг, 65%) в виде белой пены.

Схема 17. Синтез 2'-дезоксидеокси-2'-(R)-фтор-5-йодуридинфосфорамидита (8)



2'-Дезокси-2'-(R)-фтор-5-йодуридин (6).

ICl (7,3 мл, 146 ммоль) добавляли к раствору 2'-дезоксидеокси-2'-фторуридина 5 (20,0 г, 81,2 ммоль) в MeOH (400 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 17 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. К полученному неочищенному остатку (49,1 г) добавляли DCM (200 мл), затем осадок собирали фильтрацией и промывали с помощью DCM с получением соединения 6 (29,6 г, 97%) в виде белого порошка. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 3,56-3,61 (m, 1H), 3,77-3,82 (m, 1H), 3,86-3,89 (m, 1H), 4,09-4,21 (m, 1H), 5,01 (ddd, J=1,5, 5,0, 53,0 Гц, 1H), 5,37 (t, J=4,5 Гц, 1H), 5,58 (d, J=6,5 Гц, 1H), 5,84 (dd, J=1,5, 17,0 Гц, 1H), 8,51 (s, 1H), 11,71 (s, 1H).

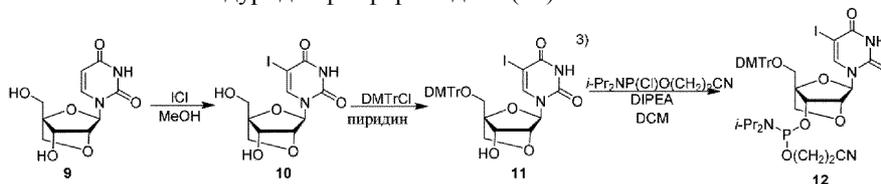
2'-Дезокси-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-(R)-фтор-5-йодуридин (7).

В атмосфере Ar добавляли DMTTrCl (28,1 г, 83,0 ммоль) к раствору соединения 6 (29,4 г, 79,0 ммоль) в безводном пиридине (400 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакцию гасили с помощью MeOH и разбавляли с помощью EtOAc. Органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (98,8 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 0-50%) с получением соединения 7 (49,5 г, 93%) в виде желтой пены. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 3,20-3,25 (m, 2H), 3,72 (s, 6H), 3,97-4,01 (m, 1H), 4,26-4,36 (m, 1H), 5,16 (dd, J=4,5, 53,0 Гц, 1H), 5,60 (d, J=7,0 Гц, 1H), 5,82 (d, J=20,5 Гц, 1H), 6,85-7,41 (m, 13H), 8,06 (s, 1H), 11,81 (s, 1H); ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆) δ: 55,0, 62,4, 68,1 (d, J=13,0 Гц), 69,7, 81,3, 85,6, 89,4 (d, J=28,0 Гц), 93,3 (d, J= 146 Гц), 113,2, 126,7, 127,6, 127,9, 129,7, 135,3, 135,4, 144,7, 145,0, 149,8, 158,0, 158,1, 160,6; HRMS рассчитано для C₃₀H₂₉FIN₂O₇ (M⁺) 675,0998.

3'-O-[2-Цианоэтоксидиизопропиламино)фосфино]-2'-дезоксидеокси-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-(R)-фтор-5-йодуридин (8).

В атмосфере Ar к раствору соединения 7 (1,20 г, 1,78 ммоль) в безводном DCM (15 мл) при 0°C добавляли DIPEA (1,5 мл, 8,90 ммоль) и i-Pr₂NP(O)(Cl)O(CH₂)₂CN (0,48 мл, 2,14 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакцию гасили насыщенным NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Комбинированный органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (1,71 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 60%) с получением соединения 8 (1,29 г, 83%) в виде белой пены.

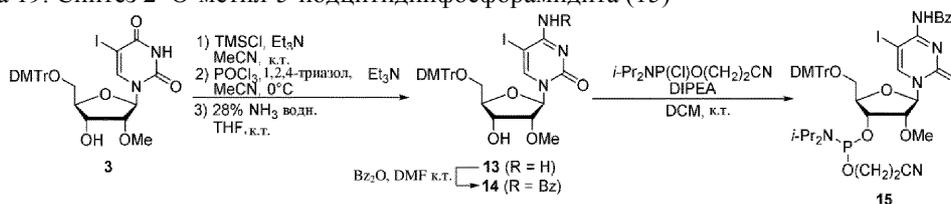
Схема 18. Синтез LNA-5-йодуридинфосфорамидита (12)



Синтез соединения 12. Соединение 12 (производное LNA) синтезировали с помощью процедуры, аналогичной процедуре для соединения 8 на схеме 2.

2. Синтез производных 5-йодцитидина.

Схема 19. Синтез 2'-O-метил-5-йодцитидинфосфорамидита (15)



5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-2'-O-метил-5-йодцитидин (13).

В атмосфере Ar к раствору 3 (5,00 г, 7,28 ммоль) в безводном MeCN (50 мл) при 0°C добавляли Et₃N (8,1 мл, 58,2 ммоль) и TMSCl (1,8 мл, 14,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в DCM, и промывали водой и соевым раствором, и высушивали над Na₂SO₄. После выпаривания растворителя образовывалась пена (6,21 г), которую растворяли в безводном MeCN (50 мл) в атмосфере Ar. Затем к этому раствору добавляли Et₃N (15,3 мл, 110 ммоль), 1,2,4-триазол (5,04 г, 73,0 ммоль) и POCl₃ (1,3 мл, 14,6 ммоль) при -40°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч, гасили насыщенным NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой промывали с помощью H₂O и солевого раствора, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Затем 28% водный NH₃ (3,0 мл) добавляли к раствору полученного неочищенного материала (6,32 г) в THF (18 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Реакционную смесь растворяли в DCM. Органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (6,10 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (0-10% MeOH в DCM) с получением соединения 13 (3,29 г, 66% для 3 стадий) в виде белой пены.

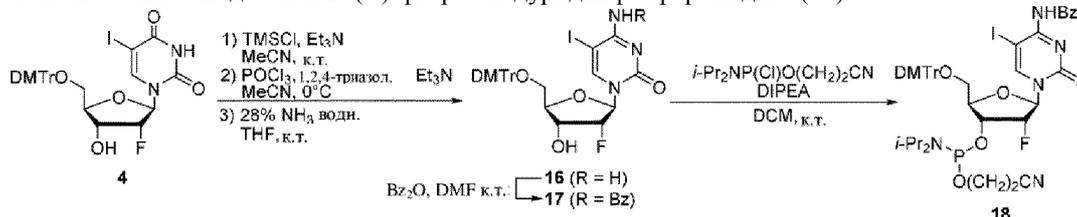
N4-Бензоил-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-O-метил-5-йодцитидин (14).

В атмосфере Ar к раствору соединения 13 (2,80 г, 4,08 ммоль) в безводном DMF (10 мл) при комнатной температуре добавляли Bz₂O (1,02 г, 4,49 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (4,14 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 30-50%) с получением соединения 14 (1,84 г, 57%) в виде желтой пены.

N4-Бензоил-3'-O-[2-цианоэтокси(диизопропиламино)фосфино]-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-O-метил-5-йодцитидин (15).

В атмосфере Ar к раствору соединения 14 (500 мг, 0,633 ммоль) в безводном DCM (5,0 мл) при 0°C добавляли DIPEA (0,54 мл, 3,17 ммоль) и *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN (0,17 мл, 0,769 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакцию гасили насыщенным NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Комбинированный органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (677 мг) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 20-40%) с получением соединения 15 (400 мг, 64%) в виде белой пены.

Схема 20. Синтез 2'-дезоксидеокси-2'-(R)-фтор-5-йодуридинфосфорамидита (18)



2'-Дезокси-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-(R)-фтор-5-йодцитидин (16).

В атмосфере Ar к раствору 7 (2,10 г, 3,11 ммоль) в безводном MeCN (20 мл) при 0°C добавляли Et₃N (3,5 мл, 24,9 ммоль) и TMSCl (0,79 мл, 6,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Реакционную смесь затем концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в DCM, промывали водой и соевым раствором и высушивали над Na₂SO₄. После выпаривания растворителя образовывалась пена (2,50 г), которую растворяли в безводном MeCN (20 мл) в атмосфере Ar. Затем к этому раствору добавляли Et₃N (6,5 мл, 46,7 ммоль), 1,2,4-триазол (2,15 г, 31,1 ммоль) и POCl₃ (0,57 мл, 6,23 ммоль) при -40°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч, гасили насыщенным NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический слой промывали с помощью H₂O и солевого раствора, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Затем 28% водный NH₃ (1,5 мл) добавляли к раствору полученного неочищенного материала (2,49 г) в THF (9,0 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Реакционную смесь растворяли в DCM. Органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (2,88 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (MeOH в DCM, 0-10%) с получением соединения 16 (1,48 г, 70% для 3 стадий) в виде коричневой пены.

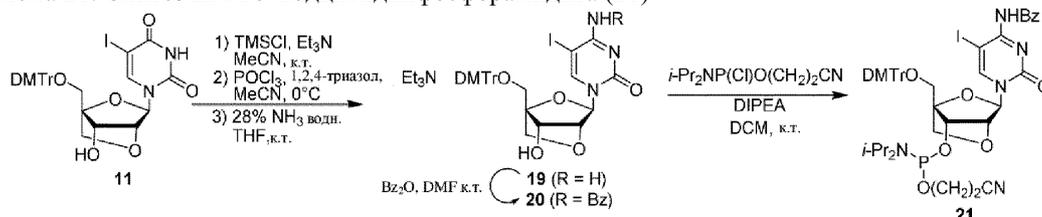
N4-Бензоил-2'-дезоксидеокси-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-2'-(R)-фтор-5-йодцитидин (17).

В атмосфере Ar к раствору соединения 16 (1,30 г, 1,93 ммоль) в безводном DMF (8,0 мл) при комнатной температуре добавляли Bz₂O (480 мг, 2,12 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (2,00 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в н-гексане, 30-50%) с получением соединения 17 в виде желтой пены (889 мг, 59%).

N^{4'}-Бензоил-3'-O-[2-цианоэтоксидиизопропиламино)фосфино]-2'-дезоксид-5'-O-(4,4'-диметокситри-тил)-2'-(R)-фтор-5-йодцитидин (18).

В атмосфере Ar к раствору соединения 17 (260 мг, 0,334 ммоль) в безводном DCM (5,0 мл) при 0°C добавляли DIPEA (0,29 мл, 1,67 ммоль) и *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN (90 мкл, 0,401 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакцию гасили с помощью нас. NaHCO₃ и экстрагировали с помощью EtOAc. Комбинированный органический слой промывали водой и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (375 мг) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в *n*-гексане, 20-40%) с получением соединения 18 (280 мг, 86%) в виде белой пены.

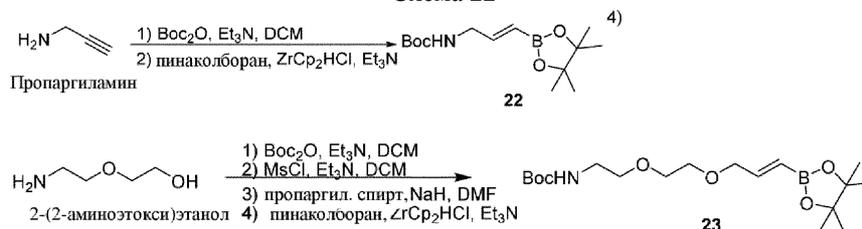
Схема 21. Синтез LNA-5-йодцитидинфосфорамидита (21)



Синтез соединения 21. Соединение 21 синтезировали с помощью процедуры, аналогичной процедуре для соединения 18 на схеме 20.

3. Синтез сложного эфира бороновой кислоты, конъюгированного с лигандом.

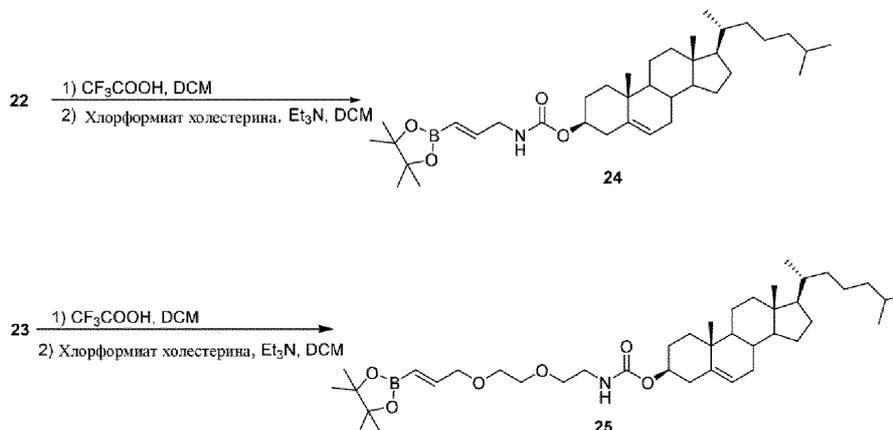
Схема 22



(Е)-трет-Бутил-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)аллилкарбамат (22).

В атмосфере Ar пропаргиламин (5,0 г, 90,8 ммоль) в безводном DCM (100 мл) добавляли к раствору Et₃N (25,3 мл, 182 ммоль) и ди-трет-бутилдикарбоната (22,9 мл, 99,9 ммоль) в безводном DCM (200 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакцию гасили насыщенным NH₄Cl и разбавляли с помощью EtOAc. Органический слой промывали насыщенным NH₄Cl и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме с получением неочищенного N-Бос-пропаргиламина (12,6 г) в виде коричневого масла. Затем в атмосфере Ar к этому неочищенному материалу при комнатной температуре добавляли пинакоборан (17,8 мл, 123 ммоль), Et₃N (1,1 мл, 8,18 ммоль) и ZrCp₂HCl (2,11 г, 8,18 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 15 ч. Затем реакцию гасили насыщенным NH₄Cl при 0°C и полученную смесь разбавляли с помощью EtOAc. Органический слой промывали насыщенным NH₄Cl и соевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (35,9 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (EtOAc в *n*-гексане, 10-20%) с получением соединения 22 (14,0 г, 54% за 2 стадии) в виде желтого масла.

Схема 23

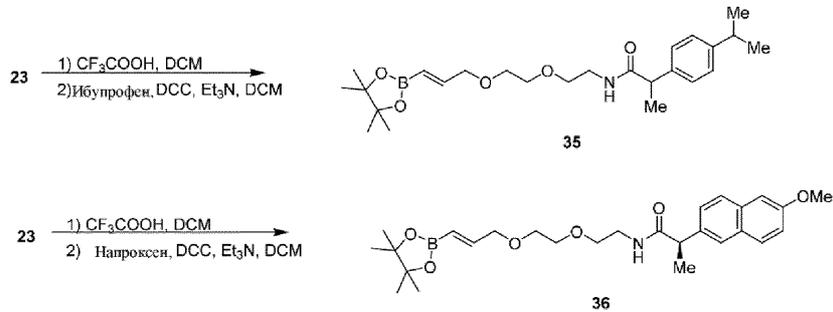


(Е)-Холестерил-3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)аллилкарбамат (24).

Соединение 22 (2,60 г, 9,18 ммоль) растворяли в CF₃COOH/DCM (9:1, 100 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Полученную смесь затем концентрировали в вакууме и оставший-

ся CF_3COOH удаляли совместным выпариванием (3×толуол, 3×DCM) с получением неочищенной аммониевой соли TFA (3,01 г) в виде коричневого масла. В атмосфере Ar к раствору этого неочищенного амина в безводном DCM (50 мл) при комнатной температуре добавляли Et_3N (3,8 мл, 27,5 ммоль) и холестерилхлорформиат (4,33 г, 9,64 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем реакцию гасили насыщенным NaHCO_3 . Органический слой промывали солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4 и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток (6,90 г) очищали с помощью колоночной хроматографии (диоксид кремния 100 г; растворитель: EtOAc в n -гексане, 10-20%) с получением соединения 24 в виде белой пены (4,76 г, 87% за 2 стадии).

Схема 24



4. Конъюгация посредством реакции перекрестного сочетания Сузуки-Мияура.

Схема 25

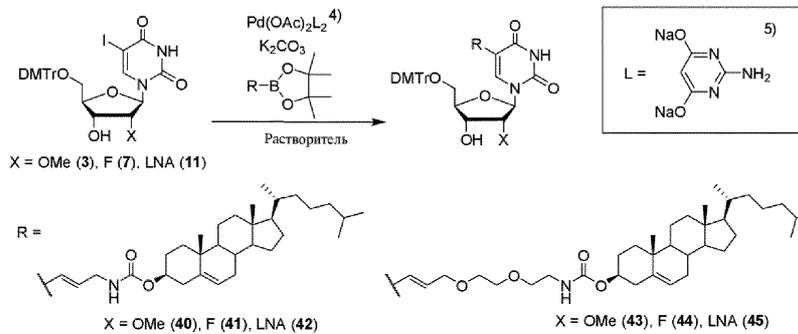
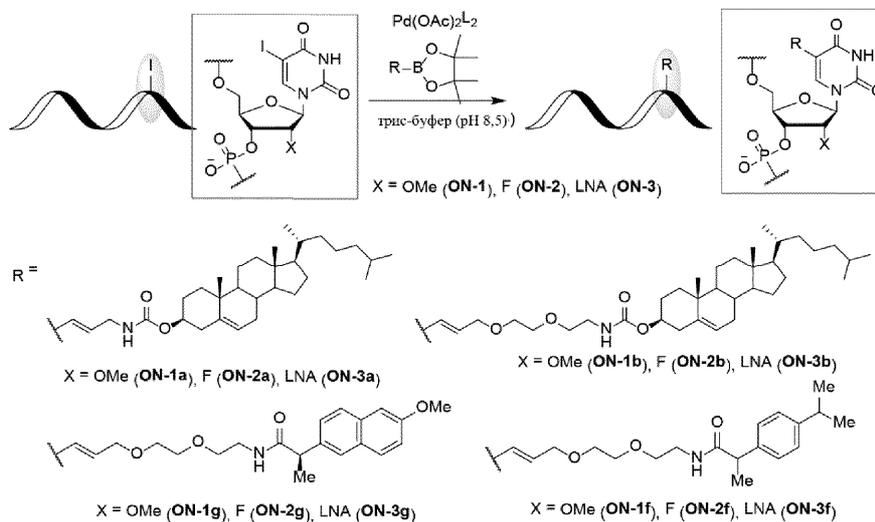
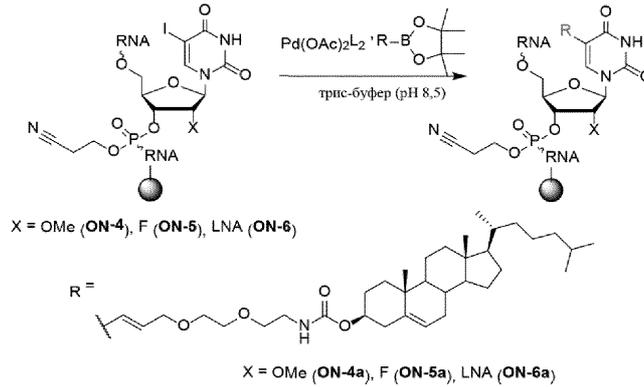


Схема 26



Как показано на схемах 25, 26, одноцепочечный олигонуклеотид конъюгировали с лигандом (таким как липофильный фрагмент), продукт очищали с последующей гибридизацией с комплементарными цепями, получая конъюгаты siRNA.

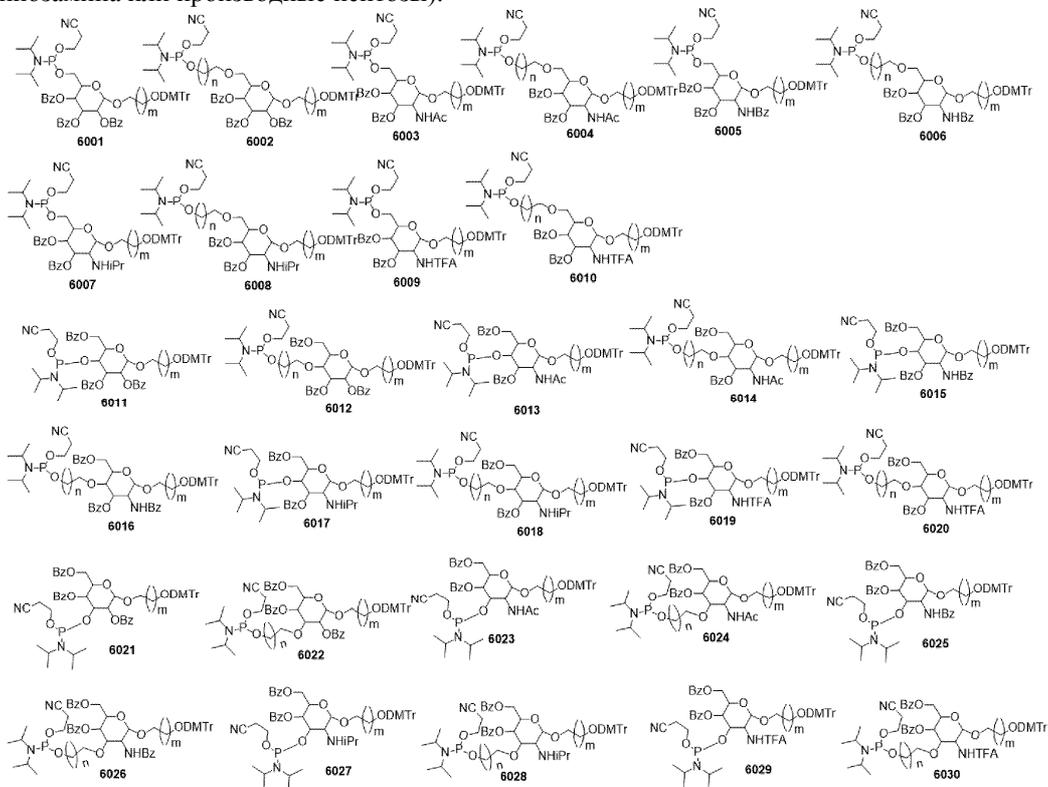
Схема 27. Конъюгация на CPG

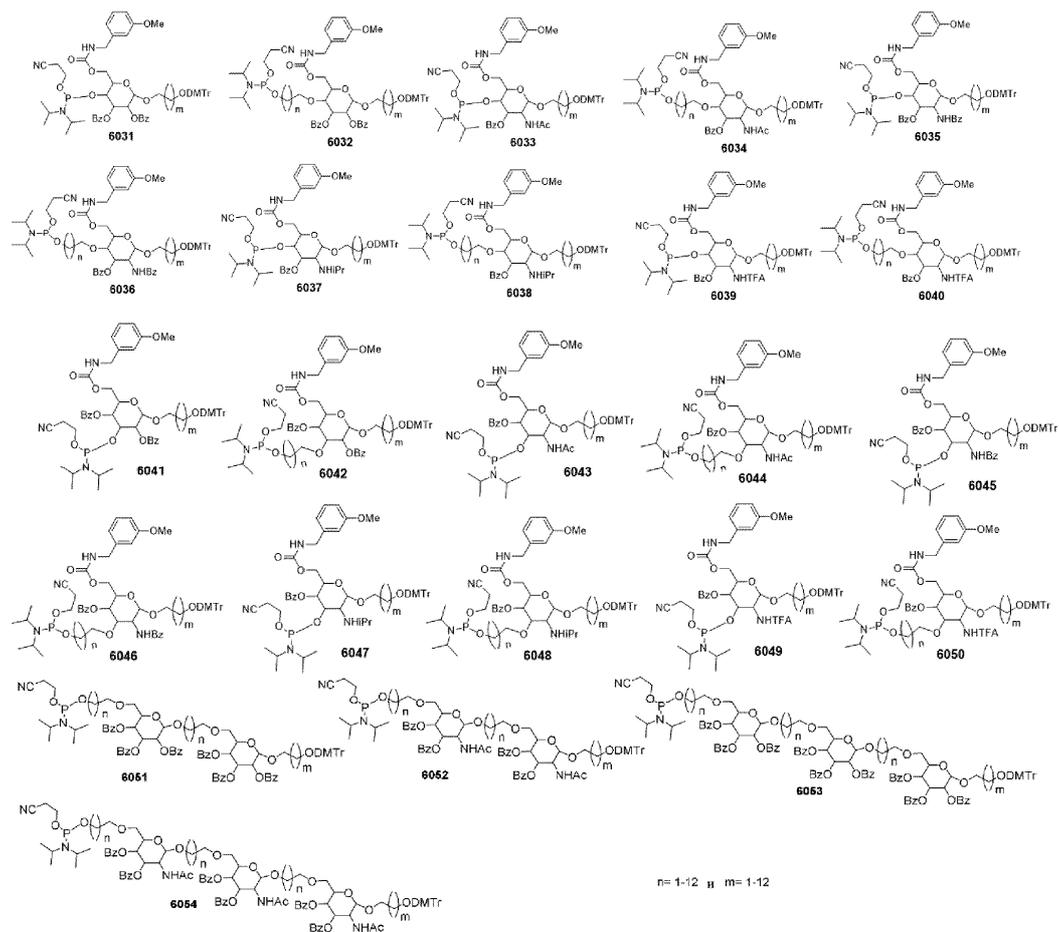


На схеме 27 показана процедура конъюгирования лиганда (такого как липофильный фрагмент) с РНК, присоединенной к CPG.

Пример 8. Функционализированные биорасщепляемые линкеры и фосфорамидиты.

Схема 28. Различные углеводы (галактоза, галактозамин, глюкоза, глюкозамин, манноза, производные маннозамина или производные пентозы).

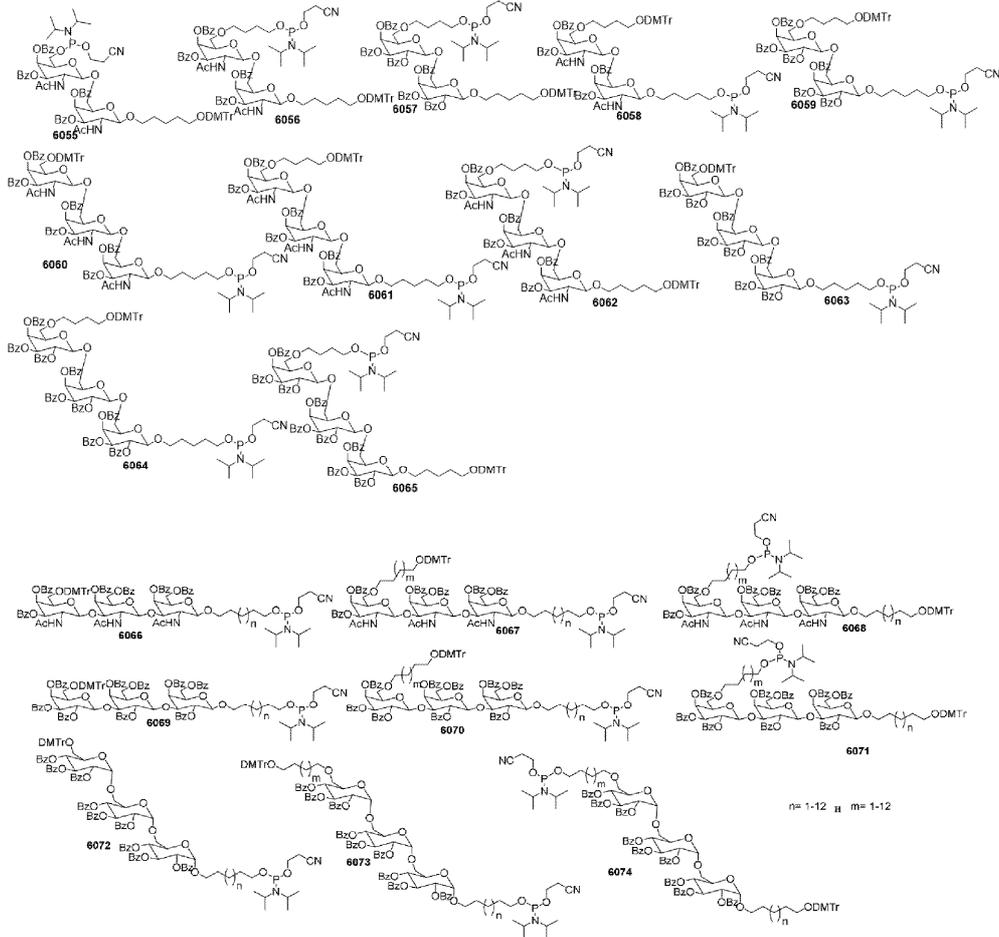




Конъюгат siRNA синтезировали на твердой подложке с последовательным добавлением одного или нескольких расщепляемых линкеров, показанных на схеме 28, и последующей гибридизацией с комплементарными цепями, как показано на фиг. 3.

Пример 9. Функционализированные расщепляемые линкеры и фосфорамидиты.

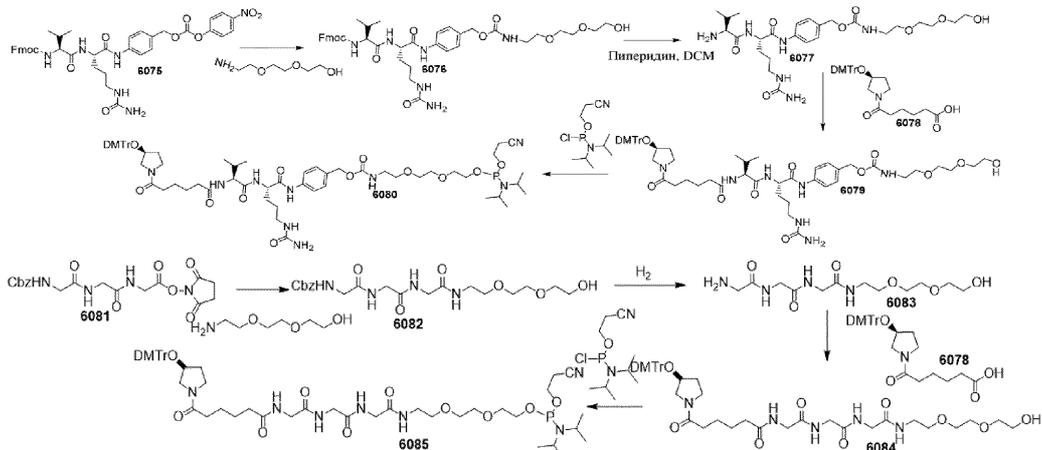
Схема 29. Различные модифицированные углеводы (ди- или трисахариды галактозы, галактозамина, глюкозы, глюкозамина, маннозы, производные маннозамина)



Конъюгат siRNA синтезировали на твердой подложке с последовательным добавлением одного или нескольких расщепляемых линкеров, показанных на схеме 29, и последующей гибридизацией с комплементарными цепями, как показано на фиг. 3.

Пример 10. Функционализированные расщепляемые протеазой линкеры и фосфорамидиты.

Схема 30



Конъюгат siRNA синтезировали на твердой подложке с последовательным добавлением одного или нескольких расщепляемых линкеров, показанных на схеме 30, и последующей гибридизацией с комплементарными цепями, как показано на фиг. 3.

Пример 11. Нокдаун mRNA в глазу мыши.

Сайленсинг гена бета-катенина изучали при участии конъюгатов siRNA, перечисленных в табл. 1а, на мышях C57BL/6 дикого типа (n=5) с последующей интравитреальной инъекцией в дозе 7,5 мкг/глаз (1,5 мкл) с умерщвлением мышей на 14 день. Результаты показаны на фиг. 4.

Таблица 1а

Дуплекс siRNA, используемый для интравитреальной инъекции мышам

Название дуплекса	Название олигон.	Мишень	цепь	олигопосл.	расчетная масса	Обнаруж. MW	Конъюгация
AD-77885, 1	A-154945, 1	CTNNB1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfugauucgaasadTdTL10	8306,91	8302,61	Нур-С6-Chol
	A-147656, 2	CTNNB1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17	
AD-77886, 1	A-155621, 1	CTNNB1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfugauucgaaaQ197L245	8164,95	8160,73	Нур-С6-ибупрофен
	A-147656, 1	CTNNB1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfaUfCfaaucCfaAfcagua	7738,13	7733,17	

	2		л.	sgsc				
AD-77887, 1	A-156183, 1	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL262	7508,23	7504,43		Нуп-С6-С16
	A-147656, 2	CTNNB 1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD-75651, 1	A-148043, 1	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL52	7452,11	7448,37		Нуп-С6-С12
	A-147656, 2	CTNNB 1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD-75652, 2	A-148044, 1	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL55	7532,24	7528,43		Нуп-С6-линолеил
	A-147656, 2	CTNNB 1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD-75653, 2	A-148045, 1	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL57	7536,27	7532,46		Нуп-С6-С18
	A-147656, 2	CTNNB 1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD-73952, 3	A-147655, 3	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL10	7682,46	7678,54		Нуп-С6-Chol
	A-147656, 2	CTNNB 1	анти-смысл.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD-75655, 1	A-148047, 1	CTNNB 1	смысл.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL8	7269,81	7266,2		Нуп-С6-NH2

	A- 147656, 2	CTNNB 1	анти смыс л.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD- 75656, 2	A- 151280, 1	CTNNB 1	смыс л.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL252	7580,3	7576,43	Нуп-С6- DHA	
	A- 147656, 2	CTNNB 1	анти смыс л.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD- 77884, 1	A- 152960, 2	NA	смыс л.	usascuguUfgGfAfUfu gau(Uhd)cgasasa	7220,07	7216,27	С16 при N6	
	A- 147656, 2	CTNNB 1	анти смыс л.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		
AD- 75654, 3	A- 148046, 2	CTNNB 1	смыс л.	usascuguUfgGfAfUfu gauucgaaaL148	7888,83	7884,76		
	A- 147656, 2	CTNNB 1	анти смыс л.	VP(Tams)UfsucgAfa UfCfaaucCfaAfcagua sgsc	7738,13	7733,17		

* Верхние и строчные буквы курсивом указывают на модификации сахара 2'-дезоксигуанозина (2'-F) и 2'-О-метил (2'-OMe) соответственно аденозину, цитидину, гуанозину и уридину; s обозначает фосфотиоатную (PS) связь; VP - винилфосфонат; Uhd, 2'-О-гексадецилуридин'; Там, 2'-О-(N-метилацетамид)тимидин

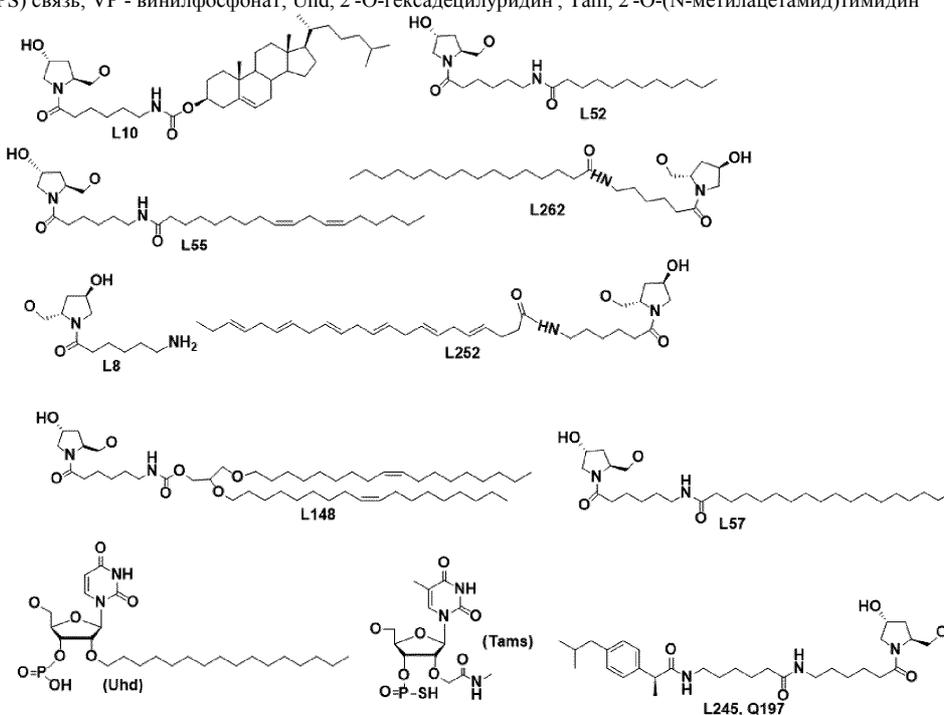


Таблица 1b

Краткое описание модификаций смысловой цепи для дуплекса siRNA приведено в табл. 1a

Название дуплекса	Модификации смысловой цепи
AD-77885.1	3'-концевой холестерин с расщепляемым линкером dTdT
AD-77886.1	3'-конец с 2 x ибупрофен
AD-77887.1	3'-конец с C16
AD-75651.1	3'-конец с C12
AD-75652.2	3'-конец с C18:2
AD-75653.2	3'-конец с C18
AD-73952.3	3'-конец с холестерином
AD-75655.1	3'-конец C6-амиолинкер контроль
AD-75656.2	3'-конец с DHA (C22:6)
AD-77884.1	Внутренний C16
AD-75654.3	3'-конец с 2 x C18:1

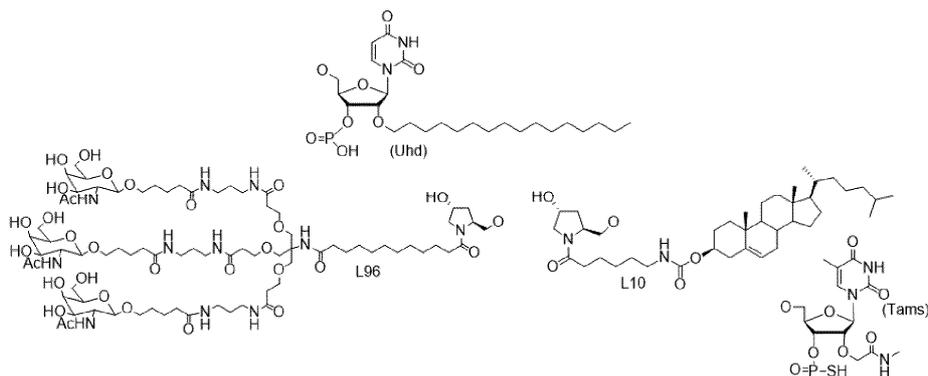
Пример 12. Нокдаун mRNA в ЦНС.

Таблица 2

Дуплексы siRNA, используемые для интратекальной инъекции в исследовании ЦНС

ID дуплекса (Мишень)	ID одной цепи	Цепь	Последовательность 5'-3'	MWрасчет. (г/моль)	MWнаблю д. (г/моль)
AD-135778 (SOD1)	A-268861	S	csasuuuuAfaUfCfCfucacucua aaL96	8585,99	8587,20
	A-268862	AS	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAf aaaugsasg	7771,18	7772,91
AD-224937 (SOD1)	A-444399	S	csasuuuuAfaUfCfCfucacucua aaL10	7502,52	7503,10
	A-268862	AS	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAf aaaugsasg	7771,18	7772,91
AD-224938 (SOD1)	A-444400	S	csasuuuu(Uhd)AfaUfCfCfucac ucuaaa	7008,30	7009,33
	A-268862	AS	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAf aaaugsasg	7771,18	7772,91
AD-224939 (SOD1)	A-444401	S	csasuuuuAfaUfCfCfucacucua aa	6798,07	6799,15
	A-268862	AS	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAf aaaugsasg	7771,18	7772,91
AD-77884 (b-cat)	A-152960	S	usascuguUfgGfAfUfugau(Uh d)cgasasa	7216,27	7218,29
	A-147656	AS	VP(Tams)UfsucgAfaUfCfaau cCfaAfcaguasgsc	7733,17	7734,01

Nf означает 2'-дезоксид-2'-фтор (2'-F), нижний регистр означает 2'-O-метил (2'-OMe) нуклеотид; s обозначает фосфотиоатную (PS) связь; VP, винилфосфонат; Uhd, 2'-O-гексадецилуридин; Tam, 2'-O-(N-метилацетамид)гмидин; транскрипты целевого гена: SOD1, супероксиддисмутаза 1; b-cat, бета-катенин.



Сайленсинг гена mRNA SOD1 (уровни среднее значение \pm стандартное отклонение) в коре головного мозга крыс Sprague Dawley изучали с конъюгатами siRNA, перечисленными в табл. 2, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг по сравнению с эндогенным контролем и группой, обработанной бета-катенином. Результаты показаны на фиг. 5.

Сайленсинг гена mRNA SOD1 (уровни среднее значение \pm стандартное отклонение) в мозжечке крыс Sprague Dawley изучали с конъюгатами siRNA, перечисленными в табл. 2, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг по сравнению с эндогенным контролем и группой, обработанной бета-катенином. Результаты показаны на фиг. 6.

Сайленсинг гена mRNA SOD1 (уровни среднее значение \pm стандартное отклонение) в шейном отделе спинного мозга крыс Sprague Dawley изучали с конъюгатами siRNA, перечисленными в табл. 2, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг по сравнению с эндогенным контролем и группой, обработанной бета-катенином. Результаты показаны на фиг. 7.

Сайленсинг гена mRNA SOD1 (уровни среднее значение \pm стандартное отклонение) в поясничном отделе спинного мозга крыс Sprague Dawley изучали с конъюгатами siRNA, перечисленными в табл. 2, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг по сравнению с эндогенным контролем и группой, обработанной бета-катенином. Результаты показаны на фиг. 8.

Сайленсинг гена mRNA SOD1 (уровни среднее значение \pm стандартное отклонение) в грудном отделе спинного мозга крыс Sprague Dawley изучали с конъюгатами siRNA, перечисленными в табл. 2, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг по сравнению с эндогенным контролем и группой, обработанной бета-катенином. Результаты показаны на фиг. 9.

Пример 13. Влияние положения липофильной модификации (C16) на последовательность siRNA.

Влияние положения липофильной модификации на всю последовательность siRNA как на смысловую, так и на антисмысловую цепи оценивали в гепатоцитах мыши с применением конъюгатов GalNAc (на основе двух последовательностей F12, показанных в табл. 3). Клетки инкубировали с каждым конъюгатом siRNA (перечислены в табл. 3) при концентрациях 2,5 и 250 нМ для свободного поглощения (без средства для трансфекции) и mRNA F12 измеряли через 24 ч с помощью RT-qPCR (как показано на фиг. 10 и фиг. 11). 2,5 мкл каждой siRNA из табл. 3 на лунку добавляли к 40 мкл среды Е Уильямса (Life Technology), содержащей $\sim 5 \times 10^3$ клеток РМН в 384-луночном планшете. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч перед очисткой РНК. Значения представлены как доля необработанных контрольных клеток. Каждый образец анализировали в техническом дубликате, и каждая точка представляет собой среднее значение 2 биологических образцов \pm % ошибки. GAPDH служил в качестве внутреннего контроля, и значения оставшихся mRNA F12 наносили на график относительно необработанных контролей. Активность *in vitro* siRNA F12, имеющих модификацию C16 в одном из внутренних положений в первичных гепатоцитах яванского макака, показала, что есть участки в дуплексах siRNA, где C16-конъюгат допустим, и все положения не одинаково активны.

siRNA, используемые для определения влияния положения
липофильной модификации (C16) на последовательности siRNA (F12)

Название дуплекса	Название олигон.	Мишень	Цепь	олигопосл.	Расчет. масса	Обнаруж. MW
AD-75869,5	A-152253,6	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaag(Uhd)gcuuuuL96	8966,96	8962,29
	A-148543,78	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuuUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-75868,17	A-151278,15	F12	смысл.	gsasaac(Uhd)CfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8966,96	8962,29
	A-148543,69	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuuUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148062,1	A-147454,151	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293109,1	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuuUf(Ghd)Afguuucsusg	7820,44	7816,35
AD-148064,1	A-147454,153	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293111,1	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuuUfgAf(7820,44	7816,3

048153

			мысл .	Ghd)uuucsusg		5
AD-84861,2	A-168581,2	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagug(Chd)uuuaL96	8966,95	8962,29
	A-148543,80	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148045,1	A-293092,1	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaAfUfAfa(Ahd)gugcuuuuL96	8966,97	8962,29
	A-148543,76	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148046,1	A-293093,1	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaAfUfAfaa(Ghd)ugcuuuuL96	8966,97	8962,29
	A-148543,77	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-84859,2	A-168579,2	F12	смысл. л.	gsasaacu(Chd)aAfUfAfaagugcuuuuL96	8978,99	8974,31
	A-148543,70	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148041,1	A-293088,1	F12	смысл. л.	gsasaacuCf(Ahd)AfUfAfaagugcuuuuL96	8966,97	8962,29
	A-148543,71	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148056,1	A-147454,144	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293103,1	F12	антисмысл .	usAfsaagCfa(Chd)uuuauUfgAfguuucsusg	7820,43	7816,35
AD-84862,2	A-168582,2	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc(Uhd)uuuL96	8966,96	8962,29

	A-148543,81	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148047,1	A-293094,1	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagu(G hd)cuuuuL96	8966,97	8962,2 9
	A-148543,79	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148057,1	A-147454,145	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuuL96	8756,56	8752,0 6
	A-293104,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfac(Uhd)uuauUf gAfguuucsusg	7820,43	7816,3 5
AD-148084,1	A-293131,1	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagu(Gh d)cuuugaL96	8982,97	8978,2 9
	A-170430,18	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148071,1	A-293118,1	F12	СМЫС Л.	gs(Ahds)acucAfaUfAfAfa gucuuugaL96	8982,96	8978,2 9
	A-170430,5	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148083,1	A-293130,1	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaag(Uhd)gcuuugaL96	8982,96	8978,2 9
	A-170430,17	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148067,1	A-147454,156	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuuL96	8756,56	8752,0 6
	A-293114,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uu(Uhd)csusg	7820,43	7816,3 5
AD-	A-293084,1	F12	СМЫС	gs(Ahds)aacuCfaAfUfAfaa	8966,96	8962,2

148037,1			л.	gugcuuuuL96		9
	A-148543,65	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148085,1	A-293132,1	F12	смысл. л.	gsasacucAfaUfAfAfagug(C hd)uuugaL96	8982,95	8978,2 9
	A-170430,19	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148055,1	A-147454,143	F12	смысл. л.	gsasaacuCfaUfAfAagugc uuuL96	8756,56	8752,0 6
	A-293102,1	F12	антис мысл .	usAfsaagCf(Ahd)cuuuUf gAfguuucsusg	7820,44	7816,3 5
AD-148075,1	A-293122,1	F12	смысл. л.	gsasacu(Chd)AfaUfAfAfag ugcuugaL96	8982,95	8978,2 9
	A-170430,9	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148038,1	A-293085,1	F12	смысл. л.	gsas(Ahd)acuCfaUfAfAaa gugcuuuL96	8966,97	8962,2 9
	A-148543,66	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148099,1	A-170194,18	F12	смысл. л.	gsasacucAfaUfAfAfagugc uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293146,1	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAf(Chd)uuuU fuGfaguucscsu	7767,38	7763,3 4
AD-148076,1	A-293123,1	F12	смысл. л.	gsasacuc(Ahd)aUfAfAfagu gcuugaL96	8995	8990,3
	A-170430,10	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9

048153

AD-148039,1	A-293086,1	F12	смысл.	gsasa(Ahd)cuCfaAfUfAfaa gugcuuuuL96	8966,97	8962,2 9
	A-148543,67	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148106,1	A-170194,25	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293153,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu(Ghd)aguucscsu	7767,4	7763,3 4
AD-148097,1	A-170194,16	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293144,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGf(Chd)AfCfuuuu UfuGfaguucscsu	7755,35	7751,3 2
AD-148096,1	A-170194,15	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293143,1	F12	антисмысл.	usCfsaaa(Ghd)cAfCfuuuuU fuGfaguucscsu	7767,4	7763,3 4
AD-84864,2	A-168584,2	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uu(Uhd)aL96	8966,96	8962,2 9
	A-148543,83	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148058,1	A-147454,146	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuuL96	8756,56	8752,0 6
	A-293105,1	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacu(Uhd)uauUf gAfguuucsusg	7820,43	7816,3 5
AD-148107,1	A-170194,26	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293154,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gf(Ahd)guucscsu	7755,36	7751,3 2

			.			
AD-148108,1	A-170194,27	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293155,1	F12	антимысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfa(Ghd)uucscsu	7755,36	7751,32
AD-148100,1	A-170194,19	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293147,1	F12	антимысл.	usCfsaaaGfcAfCf(Uhd)uuuUfuGfaguucscsu	7755,35	7751,32
AD-148082,1	A-293129,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfa(Ghd)ugcuuugaL96	8982,97	8978,29
	A-170430,16	F12	антимысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148074,1	A-293121,1	F12	смысл.	gsasac(Uhd)cAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8982,96	8978,29
	A-170430,8	F12	антимысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-79643,2	A-147454,157	F12	смысл.	gsasaacuCfaUfAfAagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-157363,2	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuu(Chds)usg	7820,36	7816,35
AD-84863,2	A-168583,2	F12	смысл.	gsasaacuCfaUfAfAagugcu(Uhd)uaL96	8966,96	8962,29
	A-148543,82	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148063,1	A-147454,152	F12	смысл.	gsasaacuCfaUfAfAagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293110,1	F12	антимысл.	usAfsaagCfacuuuauUfg(Ah	7832,48	7828,3

			мысл .	d)guuucsusg		7
AD-148073,1	A-293120,1	F12	смысл л.	gsasa(Chd)ucAfaUfAfAfagugcuugaL96	8982,95	8978,29
	A-170430,7	F12	антисмысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148086,1	A-293133,1	F12	смысл л.	gsasacucAfaUfAfAfagugc(Uhd)uugaL96	8982,96	8978,29
	A-170430,20	F12	антисмысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148098,1	A-170194,17	F12	смысл л.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293145,1	F12	антисмысл .	usCfsaaaGfc(Ahd)CfuuaUfuGfaguucscsu	7767,4	7763,34
AD-148054,1	A-147454,142	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuaL96	8756,56	8752,06
	A-293101,1	F12	антисмысл .	usAfsaag(Chd)acuuuauUfgAfguuucsusg	7832,47	7828,37
AD-148077,1	A-293124,1	F12	смысл л.	gsasacucAf(Ahd)UfAfAfagugcuugaL96	8982,97	8978,28
	A-170430,11	F12	антисмысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148068,1	A-147454,158	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuaL96	8756,56	8752,06
	A-293115,1	F12	антисмысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucs(Uhds)g	7820,37	7816,35
AD-148072,1	A-293119,1	F12	смысл л.	gsas(Ahd)cucAfaUfAfAfagugcuugaL96	8982,97	8978,28

	A-170430,6	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD- 148105,1	A- 170194,24	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293152,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUf(U hd)Gfaguucscsu	7755,35	7751,3 2
AD- 148066,1	A- 147454,155	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293113,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg u(Uhd)ucsusg	7820,43	7816,3 5
AD- 148069,1	A- 147454,159	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293116,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsus(Ghd)	7820,44	7816,3 5
AD- 148109,1	A- 170194,28	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293156,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfag(Uhd)ucscsu	7755,35	7751,3 2
AD- 148048,1	A-293095,1	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuu(Ahd)L96	8966,97	8962,2 9
	A- 148543,84	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD- 148065,1	A- 147454,154	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293112,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuuUfgAfg (Uhd)uucsusg	7820,43	7816,3 5
AD- 148091,1	A-293091,1	F12	СМЫС	gsasaacuCfaAfUfAf(Ahd)a	8966,97	8962,2

048153

148044,1			л.	gugcuuuuL96		9
	A-148543,75	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148110,1	A-170194,29	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293157,1	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfagu(Uhd)cscsu	7755,35	7751,3 2
AD-148040,1	A-293087,1	F12	смысл.	gsasaa(Chd)cuCfaUfUfAfa agugcuuuuL96	9286,16	9281,3 5
	A-148543,68	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148088,1	A-293135,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu u(Uhd)gaL96	8982,96	8978,2 9
	A-170430,22	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148089,1	A-293136,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu uu(Ghd)aL96	8982,97	8978,2 9
	A-170430,23	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148036,1	A-293083,1	F12	смысл.	(Ghds)asaacuCfaUfUfAfaa gugcuuuuL96	8966,96	8962,2 9
	A-148543,64	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148081,1	A-293128,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAf(Ahd)g ugcuuugaL96	8982,97	8978,2 8
	A-170430,15	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9

048153

AD-148095,1	A-170194,14	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293142,1	F12	антисмысл.	usCfsaa(Ahd)GfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7755,36	7751,32
AD-148087,1	A-293134,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu(Uhd)ugaL96	8982,96	8978,29
	A-170430,21	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148101,1	A-170194,20	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293148,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfu(Uhd)uaUfuGfaguucscsu	7755,35	7751,32
AD-148113,1	A-170194,32	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293160,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucscs(Uhd)	7755,35	7751,32
AD-148052,1	A-147454,140	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293099,1	F12	антисмысл.	usAfsa(Ahd)gCfacuuuauUfgAfguuucsug	7820,44	7816,35
AD-148112,1	A-170194,31	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293159,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguucs(Chds)u	7755,28	7751,32
AD-148111,1	A-170194,30	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293158,1	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuaUfuGfaguu(Chds)csu	7755,28	7751,32

			.			
AD-148042,1	A-293089,1	F12	смысл.	gsasaacuCfa(Ahd)UfAfaagugcuuuuL96	8979	8974,31
	A-148543,72	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148090,1	A-293137,1	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcuuug(Ahd)L96	8982,97	8978,28
	A-170430,24	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148043,1	A-293090,1	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUf(Ahd)aagugcuuuuL96	8979	8974,31
	A-148543,74	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-74210,29	A-147454,136	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-148543,63	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7610,04	7606,12
AD-148070,1	A-293117,1	F12	смысл.	(Ghds)asacucAfaUfAfAfaagugcuuugaL96	8982,96	8978,28
	A-170430,4	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148059,1	A-147454,147	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuuL96	8756,56	8752,06
	A-293106,1	F12	антисмысл.	usAfsaagCfacuu(Uhd)auUfgAfguuucsusg	7820,43	7816,35
AD-85402,4	A-170194,9	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfaagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-170430,3	F12	антисмысл.	usCfsaaaGfcAfCfuuuuUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09

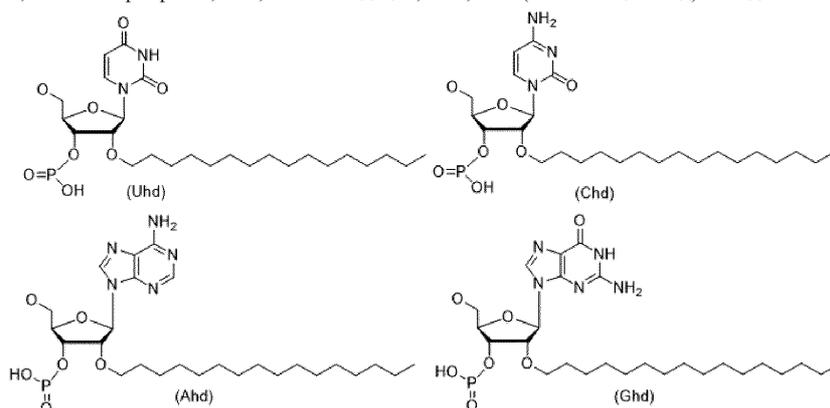
048153

			мысл .	Gfaguucscsu		9
AD-148053,1	A-147454,141	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293100,1	F12	антис мысл .	usAfsaa(Ghd)CfacuuuauUf gAfguuucsusg	7820,44	7816,3 5
AD-148051,1	A-147454,139	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293098,1	F12	антис мысл .	usAfs(Ahd)agCfacuuuauUf gAfguuucsusg	7820,44	7816,3 5
AD-148094,1	A-170194,13	F12	смысл л.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293141,1	F12	антис мысл .	usCfsa(Ahd)aGfcAfCfuuaa UfuGfaguucscsu	7755,36	7751,3 2
AD-148080,1	A-293127,1	F12	смысл л.	gsasacucAfaUfAf(Ahd)agu gcuuugaL96	8995	8990,3
	A-170430,14	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuaaUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD-148104,1	A-170194,23	F12	смысл л.	gsasacucAfaUfAfAfagugcu uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293151,1	F12	антис мысл .	usCfsaaaGfcAfCfuuaa(Uhd))uGfaguucscsu	7767,39	7763,3 4
AD-84860,2	A-168580,2	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAf(Uhd)Afaag ugcuuaaL96	8978,99	8974,3 1
	A-148543,73	F12	антис мысл .	usAfsaagCfacuuuauUfgAfg uuucsusg	7610,04	7606,1 2
AD-148049,1	A-147454,137	F12	смысл л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6

	A-293096,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	(Uhds)AfsaagCfacuuuauUf gAfguuucsusg	7820,37	7816,3 5
AD- 148060,1	A- 147454,148	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293107,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuu(Ahd)uUf gAfguuucsusg	7820,44	7816,3 5
AD- 148102,1	A- 170194,21	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagugc uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293149,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuU(Uhd)a UfuGfaguucscsu	7755,35	7751,3 2
AD- 148092,1	A- 170194,11	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagugc uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293139,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	us(Chds)aaaGfcAfCfuuuU fuGfaguucscsu	7767,32	7763,3 4
AD- 148061,1	A- 147454,150	F12	СМЫС Л.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc uuuaL96	8756,56	8752,0 6
	A-293108,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usAfsaagCfacuuuau(Uhd)g Afguuucsusg	7832,47	7828,3 7
AD- 148079,1	A-293126,1	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUf(Ahd)Afa gcuuugaL96	8995	8990,3
	A- 170430,13	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuuuUfu Gfaguucscsu	7544,96	7541,0 9
AD- 148103,1	A- 170194,22	F12	СМЫС Л.	gsasacucAfaUfAfAfaagugc uugaL96	8772,56	8768,0 5
	A-293150,1	F12	АНТИС МЫСЛ .	usCfsaaaGfcAfCfuU(Ahd) UfuGfaguucscsu	7755,36	7751,3 2
AD-	A-	F12	СМЫС	gsasaacuCfaAfUfAfaagugc	8756,56	8752,0

79644,2	147454,149		л.	uuuaL96		6
	A-157364,2	F12	антисмысл	usAfsaagCfacuuua(Uhd)UfgAfguuucsusg	7820,43	7816,35
AD-148093,1	A-170194,12	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293140,1	F12	антисмысл	usCfs(Ahd)aaaGfcAfCfuuaaUfuGfaguucscsu	8098,6	8094,39
AD-148091,1	A-170194,10	F12	смысл.	gsasacucAfaUfAfAfagugcuuugaL96	8772,56	8768,05
	A-293138,1	F12	антисмысл	(Uhds)CfsaaaGfcAfCfuuaaUfuGfaguucscsu	7755,29	7751,32
AD-148078,1	A-293125,1	F12	смысл.	gsasacucAfa(Uhd)AfAfagugcuuugaL96	8994,99	8990,31
	A-170430,12	F12	антисмысл	usCfsaaaGfcAfCfuuaaUfuGfaguucscsu	7544,96	7541,09
AD-148050,1	A-147454,138	F12	смысл.	gsasaacuCfaAfUfAfaagugcuuuaL96	8756,56	8752,06
	A-293097,1	F12	антисмысл	us(Ahds)aagCfacuuuauUfgAfguuucsusg	7832,47	7828,37

* Верхние и строчные буквы курсивом указывают на модификации сахара 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) и 2'-О-метил (2'-ОМе) соответственно аденозину, цитидину, гуанозину и уридину; s обозначает фосфотиоатную (PS) связь; VP-винилфосфонат; Nhd, 2'-О-гексадецил; Tam, 2'-О-(N-метилацетамид) тимидин.



Пример 14. Связывание с белками плазмы крови конъюгатов siRNA C16.

Характеристики связывания с белком (с применением человеческого сывороточного альбумина) дуплексов siRNA, имеющих липофильные модификации, определяли с использованием анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Дуплексы инкубировали с человеческим сывороточным альбумином и определяли несвязанную фракцию. Подробности протоколов следующие. Дуплексы при исходной концентрации 10 мкМ разбавляли до конечной концентрации 0,5 мкМ (общий объем 20 мкл), содержащей 0, 20 или 90% сыворотки в 1× PBS. Образцы смешивали, центрифугировали в течение 30 с, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После завершения инкубации к каждому образцу добавляли 4 мкл 6х раствора для загрузки геля для EMSA, центрифугировали в течение 30 с и 12 мкл каждого образца загружали в 26-луночный 10% PAGE BioRad (электрофорез в полиакриламидном геле). Гель прогоняли в течение 1 ч при 100 В. После завершения эксперимента гель удаляли

из оболочки и промывали в 50 мл 10% TBE (трис-основание, борная кислота и EDTA). После завершения промывки к гелю добавляли 5 мкл SYBR Gold, обеспечивали инкубирование при комнатной температуре в течение 10 мин и снова промывали гель в 50 мл 10% TBE. Для считывания геля применяли систему документации гелей Gel Doc XR+ с использованием следующих параметров: приложение для визуализации устанавливали на SYBR Gold, размер устанавливали на гель Criterion Bio-Rad, экспозицию устанавливали на автоматическую для интенсивных полос, подсветку насыщенных пикселей поворачивали на единицу, а цвет устанавливали на серый. Обнаружение, анализ молекулярной массы и вывод были отключены. После получения чистой фотографии геля для обработки изображения использовали Image Lab 5.2. Дорожки и полосы были вручную настроены для измерения интенсивности полосы. Значение интенсивности полос каждого образца нормализовали к PBS для получения фракции несвязанной siRNA. На основании этого измерения была определена относительная гидрофобность и отображена на фиг. 12. Некоторые дуплексные участки демонстрируют среднее связывание с белками, и это транслируется в лучшую активность *in vitro* (см. пример 13).

Пример 15. Определение значений Kd для связывания с белками плазмы крови (корреляция с гидрофобностью) - меньшее число указывает на прочное связывание.

Процедура определения Kd сывороточного альбумина человека к олигонуклеотидам. Гель BioRad 10% TBE предварительно прогоняли при 100 В в течение 20 мин. Дуплексы при исходной концентрации 10 мкМ разбавляли до конечной концентрации 0,5 мкМ (общий объем 20 мкл), содержащей различные концентрации сывороточного альбумина человека (от 0 мкМ до 1000 мкМ с шагом 100). Образцы смешивали, центрифугировали в течение 30 с, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После завершения инкубации к каждому образцу добавляли 4 мкл 6х раствора для загрузки геля для EMSA, центрифугировали в течение 30 с и 12 мкл каждого образца загружали в 26-луночный 10% TBE гель BioRad. Гель запускали при 50 В в течение примерно 20 мин, чтобы весь образец загрузился на гель. После полной загрузки образцов гель прогоняли в течение 1 ч при 100 В. После завершения эксперимента гель удаляли из оболочки и промывали в 50 мл 10% TBE. После завершения промывки к гелю добавляли 5 мкл SYBR Gold, обеспечивали инкубирование при комнатной температуре в течение 10 мин и снова промывали гель в 50 мл 10% TBE. Для считывания геля применяли систему документации гелей Gel Doc XR+ с использованием следующих параметров: приложение для визуализации устанавливали на SYBR Gold, размер устанавливали на гель Criterion Bio-Rad, экспозицию устанавливали на автоматическую для интенсивных полос, подсветку насыщенных пикселей поворачивали на единицу, а цвет устанавливали на серый. Обнаружение, анализ молекулярной массы и вывод были отключены. После получения чистой фотографии геля для обработки изображения использовали Image Lab 5.2. Дорожки и полосы были вручную настроены для измерения интенсивности полосы. Значения интенсивности полос для каждого образца были нормализованы к интенсивности дуплекса без HSA для получения доли связанной siRNA относительно концентрации HSA. Результаты показаны в табл. 4, 5.

Таблица 4

ID	Значения Kd для связывания HSA
AD-64228	Н. д.
AD-74957	8,94 мкМ
AD-74954	155 мкМ
A-131350	266,4
A-150425	353,4

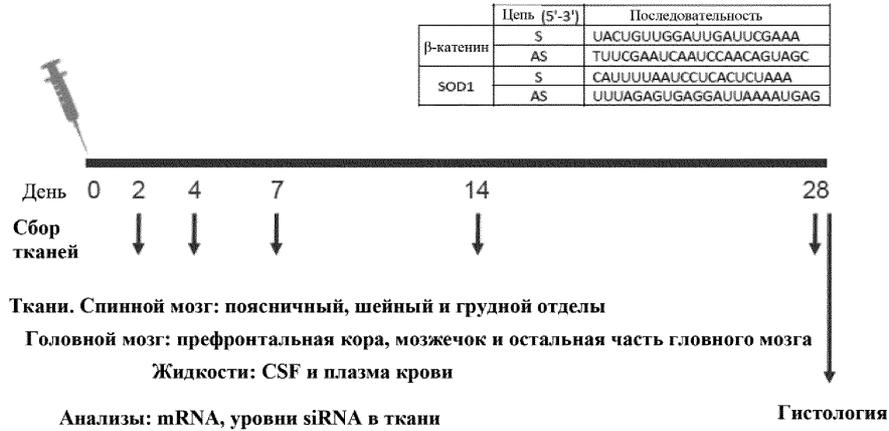
Таблица 5

Название	Название	мишень	цепь	олигопосл.	Точная MW	
дуплекса	олигон.					
AD-64228,1	A-128009,1	Нет	смысл.	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	8681,99	Нет
	A-128003,8	mTTR	антимысл.	usUfsauaGfaGfCfaagaAfcAfcugususu	7628,13	
AD-74957,1	A-150196,1	mrTTR	смысл.	Q11asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	9387,45	Холестерин на 5'-конце
	A-128003,40	mTTR	антимысл.	usUfsauaGfaGfCfaagaAfcAfcugususu	7628,13	
AD-74954,1	A-150193,1	mrTTR	смысл.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuauaaL96	8892,23	C16 при N6
	A-128003,37	mTTR	антимысл.	usUfsauaGfaGfCfaagaAfcAfcugususu	7628,13	
	A-131350,1	TTR-ASO	антимысл.	(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Geos)dGsdTsdTsdAs(m5dCs)dAsdTsdGsdAsdAs(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)dAL96	9295,01	ASO
	A-150425,1	Н. д.	антимысл.	(Teos)(Teos)(Aeos)(Teos)(Aeos)dGsdAsdGs(m5dCs)dAsdAsdGsdAsdAs(m5dCs)(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Teo)dAL96	9333,04	ASO

Пример 16. Интратекальная доставка (ИТ) конъюгатов siRNA - временная динамика однократной дозы у крыс.

Схема 16-А. Протокол и дуплексы siRNA, используемые для интратекальной инъекции в исследовании в ЦНС

- Тестировали нацеливание siRNA на β -катенин и SOD1, чтобы продемонстрировать эффективность и специфичность последовательности
- Конъюгаты siRNA в дозе 0,9 мг



Сайленсинг гена SOD1 и сайленсинг гена бета-катенина у крыс изучали с применением конъюгатов siRNA, перечисленных в табл., показанной на схеме 16-А выше, после однократной интратекальной инъекции в дозе 0,9 мг. Результаты показаны на фиг. 13-15.

На фиг. 13В показаны все исследованные участки головного и спинного мозга. На фиг. 13А и 13С показаны результаты сайленсинга SOD1 после однократного ИТ введения дозы дуплексов siRNA у крыс в различных участках, показанных на фиг. 13В. Как показано на фиг. 13А и 13С, длительный сайленсинг mRNA SOD1 наблюдается во всех исследуемых участках головного и спинного мозга. На фиг. 14А, 14В показаны результаты сайленсинга гена β -катенина после однократного ИТ введения дозы. Как показано на фиг. 14А, 14В, длительный сайленсинг β -катенина наблюдается во всех исследуемых участках головного и спинного мозга. На фиг. 15 показаны результаты сайленсинга SOD1 после однократного ИТ введения дозы дуплексов siRNA у крыс в различных участках. На фиг. 15А показаны уровни конъюгированной siRNA в CSF по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA. Как показано на чертеже, быстрый клиренс siRNA из CSF наблюдается для конъюгированной siRNA. На фиг. 15В показаны уровни конъюгированной siRNA в головном мозге по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA. Как показано на чертеже, конъюгированная siRNA характеризуется более высоким уровнем поглощения и стабильностью в головном мозге по сравнению с неконъюгированной siRNA. На фиг. 15С показаны уровни конъюгированной siRNA в мозжечке по сравнению с уровнями неконъюгированной siRNA и контрольными уровнями siRNA. Как показано на чертеже, повышенное поглощение в головном мозге конъюгированной siRNA привело к существенному улучшению нокдаун mRNA, что указывает на целевой сайленсинг. На фиг. 15А-15С показаны более высокие уровни лекарственного средства и устойчивый сайленсинг, наблюдаемый в мозге с применением конъюгата siRNA SOD1.

Пример 17. Дальнейшая очистка siRNA SOD1.

Таблица 6

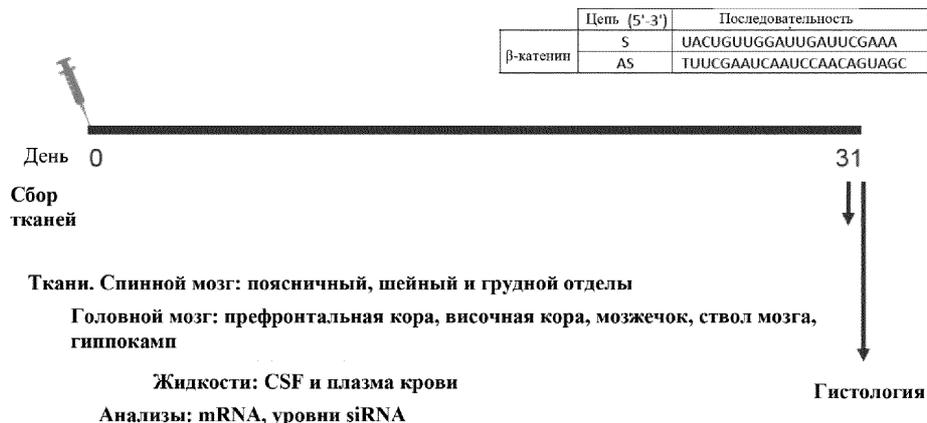
Id дуплекса	Id олигон.	цепь	мишень	олигопосл.	Молекулярная масса	Обнаруженная MW
AD-401824 (модифицированный SOD1)	A-637448	смысл.	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfuca cucuasasa	7043,976	7040,254
	A-444402	антисмысл.	SOD1	VPusUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	7851,156	7847,154
AD-401825 (исходный SOD1)	A-637448	смысл.	SOD1	csasuuu(Uhd)AfaUfCfCfuca cucuasasa	7043,976	7040,254
	A-268862	антисмысл.	SOD1	usUfsuagAfgUfGfaggaUfuAfaaaugsasg	7775,157	7771,175

В табл. 6 показаны siRNA SOD1, модифицированные с использованием различных химических компонентов. Контроль представляет собой aCSF. На фиг. 16A-16B показаны результаты сайленсинга SOD1 посредством siRNA SOD1, модифицированных с использованием различных химических компонентов в различных дозах. Как показано на фиг. 16A-16B, улучшенный сайленсинг достигался с помощью модифицированных siRNA SOD1 по сравнению с исходными siRNA SOD1 при уровне дозы в 10 раз ниже.

Пример 18. Оценка трансляции доставки конъюгата siRNA в ЦНС отличных от человека приматов (NHP) - конструкция для NHP с однократной дозой.

Схема 18-А. Протокол и дуплексы siRNA, используемые для интратекальной инъекции в исследовании в ЦНС

- Конъюгаты siRNA в дозе 72 мг – IT болюсная инъекция
- Оценивание одиночной мишени – β -катенин



Сайленсинг гена бета-катенина у отличных от человека приматов изучали с применением конъюгатов siRNA, перечисленных в таблице, показанной на схеме 18-А выше, после однократной интратекальной инъекции болюсной дозы, составляющей 72 мг. Результаты показаны на фиг. 17-23.

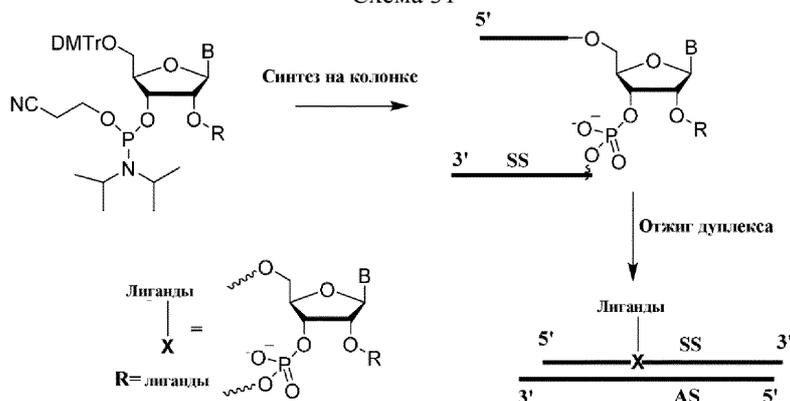
На фиг. 17 показаны уровни siRNA β -катенина в различных участках спинного и головного мозга отличных от человека приматов (NHP) на 31 день после однократного интратекального (IT) введения дозы иллюстративных дуплексов siRNA. На фиг. показано, что в момент времени 31-го дня значительные уровни siRNA все еще присутствовали во всех исследованных тканях, хотя поглощение siRNA варьируется между различными участками ЦНС, и siRNA также наблюдали в печени. На фиг. 18 показаны

результаты сайленсинга mRNA β -катенина после однократного интратекального введения дозы иллюстративных дуплексов siRNA NHP на 31 день. Как показано на фигуре, конъюгат siRNA, нацеленный на β -катенин, вызывал устойчивый нокдаун в ЦНС - по всем участкам спинного и головного мозга - в момент времени 31 день. На фиг. 19 показаны изображения, иллюстрирующие распределение siRNA β -катенина по ЦНС у отличных от человека приматов после однократного ИТ введения дозы. На фиг. 20 представлены изображения, иллюстрирующие поглощение siRNA нейронами. Как показано на фигуре, MAP2 представляет собой нейрональный маркер, и siRNA β -катенина (CTNNB) зондировали с помощью антитела к siRNA. На фиг. 21 показаны изображения, иллюстрирующие конъюгаты siRNA, локализованные в микроглии, после однократного ИТ введения дозы. Как показано на фигуре, Iba1 представляет собой маркер микроглии, и siRNA β -катенина (CTNNB) зондировали с помощью антитела к siRNA. На фиг. 22 показаны изображения, иллюстрирующие конъюгаты siRNA, локализованные в астроцитах, после однократного ИТ введения дозы. Как показано на фигуре, GFAP представляет собой маркер астроцитов, и siRNA β -катенина (CTNNB) зондировали с помощью антитела к siRNA. На фиг. 23 показано сравнение активности сайленсинга гена, наблюдаемой у крыс и NHP при дозе, масштабированной по компартменту.

Таким образом, после ИТ введения наблюдали длительный сайленсинг целевой mRNA в ЦНС крысы и NHP. Сайленсинг продлился до конца исследования. Дальнейшая оптимизация конструкций siRNA различными химическими компонентами привела к более чем 10-кратному повышению эффективности. Поглощение тканями наблюдали во всех исследуемых тканях ЦНС с уровнями лекарственного средства в диапазоне от нг/г до мг/г. Как в исследованиях на крысах, так и в исследованиях NHP было обнаружено, что интратекальное введение новых конъюгатов siRNA в целом хорошо переносится.

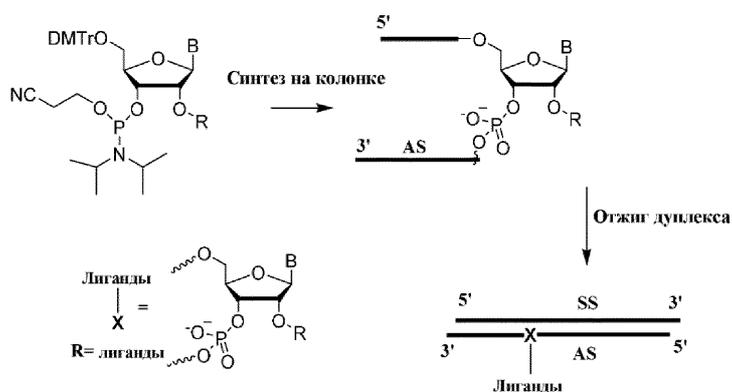
Пример 19. Внутренняя конъюгация липофильных фрагментов с siRNA.

Схема 31



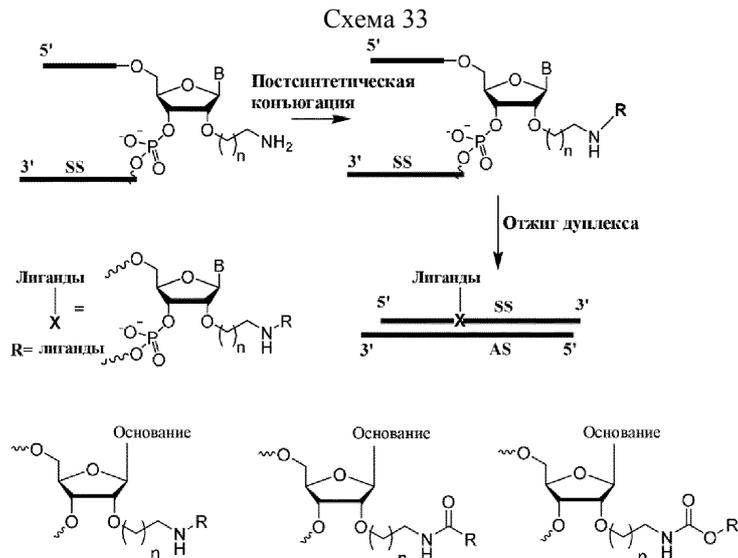
На схеме 31 показан протокол синтеза для внутренней конъюгации липофильных фрагментов с дуплексами siRNA. На схеме 31 липофильный фрагмент, R, может представлять собой C_6 - C_{30} -спирты (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин E, холестерин и т.д.).

Схема 32

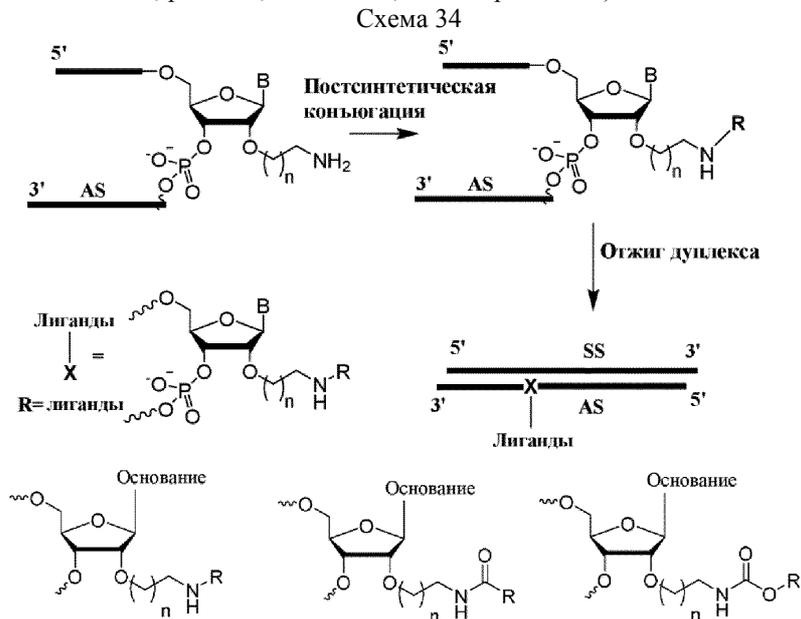


На схеме 32 показан альтернативный протокол синтеза для внутренней конъюгации липофильных фрагментов с дуплексами siRNA. На схеме 32 липофильный фрагмент, R, может представлять собой C_6 - C_{30} -спирты (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин E, холестерин и т.д.).

Пример 20. Постсинтетическая конъюгация липофильных фрагментов с siRNA



На схеме 33 показан протокол постсинтетической внутренней конъюгации липофильных фрагментов с дуплексами siRNA. На схеме 33 R или COR представляет собой C₆-C₃₀ кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексановую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т.д.). COOR представляет собой C₆-C₃₀-спирты (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин Е, холестерин и т.п.).



На схеме 34 показан альтернативный протокол постсинтетической внутренней конъюгации липофильных фрагментов с дуплексами siRNA. На схеме 34 R, или COR, или COOR представляет собой C₆-C₃₀ кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексановую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т.д.). COOR представляет собой C₆-C₃₀-спирты (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин Е, холестерин и т.д.).

Пример 21. SAR внутренних липидных конъюгатов у мышей.

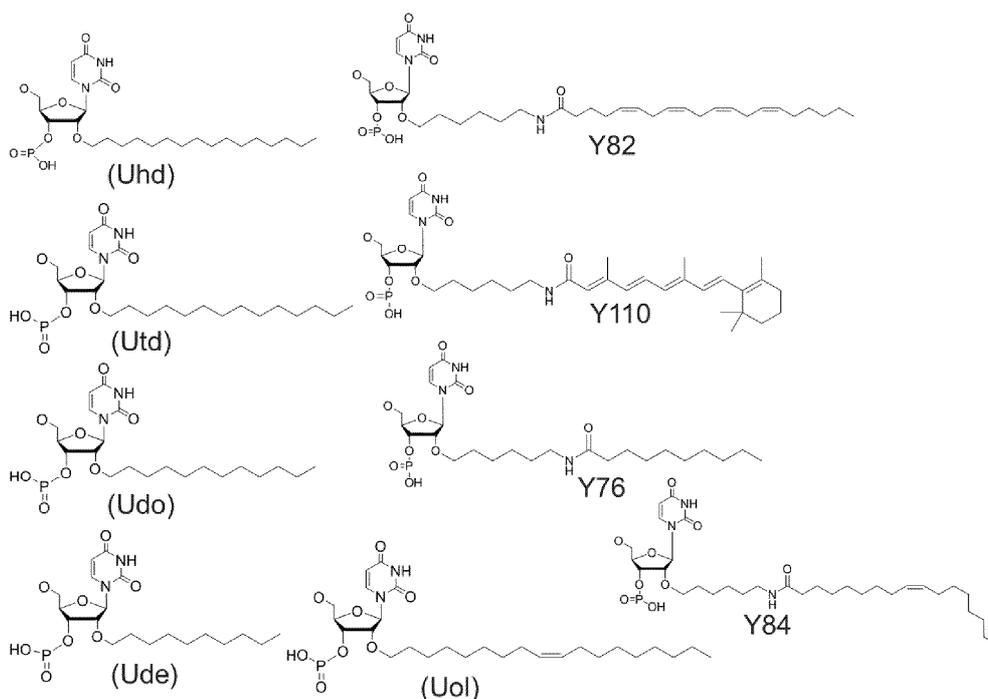
На мышцах изучали взаимосвязь между структурой и активностью siRNA и внутренней конъюгации

ей липофильных фрагментов. Последовательности в этом примере показаны в табл. 7 ниже.

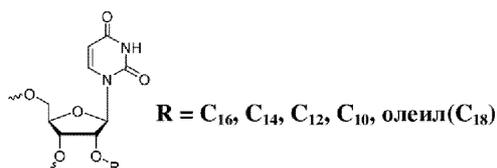
Таблица 7

Название дуплекса	Цепь	Олигопосл. (5'-3')	Лиганд/N1 на 5'-конце антисмысловой цепи
AD-307571	смысл.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16 (Uhd)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-397368	смысл.	asascag(Utd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C14 (Utd)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-397370	смысл.	asascag(Udo)GfuUfCfUfugcucuausasa	C12 (Udo)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-397371	смысл.	asascag(Ude)GfuUfCfUfugcucuausasa	C10 (Ude)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-397369	смысл.	asascag(Uol)GfuUfCfUfugcucuausasa	Олеил (C18:1) (Uol)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-418424	смысл.	asascagY84GfuUfCfUfugcucuausasa	Олеил (C18:1) (Y84)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-418422	смысл.	asascagY82GfuUfCfUfugcucuausasa	Арахидоновая кислота (Y82)
	антисмысл	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	
AD-	смысл.	asascagY110GfuUfCfUfugcucuausasa	Витамин А

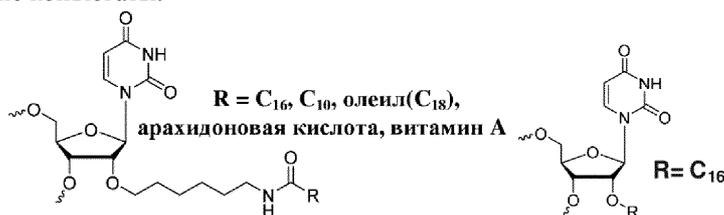
418426			(Y110)
	АНТИСМЫСЛ	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-418425	СМЫСЛ.	asascagY76GfuUfCfUfugcucuausasa	C10 (Y76)
	АНТИСМЫСЛ	VPuUfauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-418431	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/Хиральн
	АНТИСМЫСЛ	(uRs)(UfRs)auaGfaGfCfaagaAfcAfcugu(uSs)(uSs)u	ый PS-2PS
AD-397372	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/2'-OMe
	АНТИСМЫСЛ	usUfsauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-418430	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/Хиральн
	АНТИСМЫСЛ	(uRs)UfauaGfaGfCfaagaAfcAfcugu(uSs)(uSs)u	ый PS-PS
AD-418428	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/PO3
	АНТИСМЫСЛ	PusUfsauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-418427	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/ДНК
	АНТИСМЫСЛ	dTsUfsauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-418429	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/PHK
	АНТИСМЫСЛ	UsUfsauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
AD-421436	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/2'-F
	АНТИСМЫСЛ	UfsUfsauaGfagcaagaAfcAfcugususu	
	.		
AD-421439	СМЫСЛ.	asascag(Uhd)GfuUfCfUfugcucuausasa	C16/Фосфатн
	АНТИСМЫСЛ	(Pmds)uUfauaGfagcaagaAfcAfcugususu	ый пропрепарат



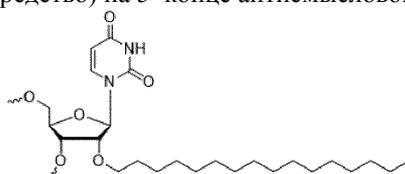
SAR внутренних липидных конъюгатов у мышей № 1 На фиг. 24 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 3 мкг или 7,5 мкг. Как показано в табл. 7 выше, siRNA модифицируют путем конъюгирования липофильного фрагмента (олеил, C₁₆, C₁₄, C₁₂ или C₁₀) во внутреннем положении смысловой цепи. Как показано на фиг. 24, способность к нокдауну TTR в отношении siRNA с липофильными конъюгациями составляет: олеил (C₁₈) ≥ C₁₆ > C₁₄ > C₁₂ > C₁₀. Этот результат иллюстрирует влияние гидрофобности на активность siRNA в отношении сайленсинга гена.



SAR внутренних липидных конъюгатов у мышей №2 На фиг. 25 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 7,5 мкг. Как показано на фиг. 25 siRNA, конъюгированные с олеилом (C₁₈), арахидоновой кислотой и конъюгатами витамина А, обладают лучшей способностью обеспечивать нокдаун TTR, чем другие конъюгаты.



SAR 5'-цепи AS с внутренними конъюгатами C₁₆ у мышей. На фиг. 26 показаны результаты уровней mRNA TTR в глазу мышей на 14 день после интравитреального введения различных иллюстративных дуплексов siRNA, показанных в табл. 7, в дозе 7,5 мкг. Как показано в табл. 7 выше, siRNA модифицируют путем конъюгирования липофильного фрагмента (C₁₆) во внутреннем положении смысловой цепи и различных модификаций (например, 2 хиральных PS; 2'-ОМЕ; VP; 1 хиральный PS; PO3; ДНК; РНК; 2'-F; фосфатный пролекарственн средство) на 5'-конце антисмысловой цепи.



Ссылки.

Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, в том числе те, что перечислены ниже, таким образом включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта, настоящая заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущественную силу.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухцепочечной iRNA, содержащее
 - антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену и содержит фосфат или имитатор фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи;
 - смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и
 - один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи,
 - где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₄-C₁₈-углеводородную цепь и
 - один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положениями 4-8 и 13-18 смысловой цепи и положениями 6-10 и 15-18 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.
2. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.1, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи посредством линкера или носителя.
3. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.1, где липофильный фрагмент дополнительно содержит функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.
4. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.1, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положениями 5, 6, 7, 15 и 17 смысловой цепи и положениями 15 и 17 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.
5. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-4, где каждая из указанных смысловой и антисмысловой цепей имеет длину от 15 до 30 нуклеотидов.
6. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-4, где каждая из указанных смысловой и антисмысловой цепей имеет длину от 19 до 25 нуклеотидов.
7. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-4, где каждая из указанных смысловой и антисмысловой цепей имеет длину от 21 до 23 нуклеотидов.
8. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.7, где смысловая цепь составляет в длину 21 нуклеотид, а антисмысловые цепи составляют в длину 23 нуклеотида, где цепи образуют двухцепочечный участок из 21 последовательной пары оснований, имеющий одноцепочечные выступы длиной 2 нуклеотида на 3'-конце.
9. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.1, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₆-C₁₈-углеводородную цепь.
10. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.9, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₁₆-углеводородную цепь.
11. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-10, где липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который замещает один или несколько нуклеотидов во внутреннем(их) положении(ях).
12. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.11, где носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пирозолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на остове из серинола или остове из диэтаноламина.
13. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-12, где липофильный фрагмент конъюгирован со средством на основе двухцепочечной iRNA посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.
14. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-13, где указанное средство на основе iRNA содержит одноцепочечный выступ по меньшей мере на одном из концов.
15. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.13, где указанный одноцепочечный выступ имеет длину 1, 2 или 3 нуклеотида.
16. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-14, где липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

17. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.16, где имитатор фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

18. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-17, дополнительно содержащее нацеливающий лиганд, который нацелен на рецептор, который опосредует доставку в ткань ЦНС.

19. Средство на основе двухцепочечной iRNA по п.18, где нацеливающий лиганд выбран из группы, состоящей из ангиопепта-2, лиганда белка, родственного липопротеиновому рецептору (LRP), лиганда связывания клетки bEnd.3, лиганда рецептора трансферрина (TfR), лиганда рецептора маннозы, белка-переносчика глюкозы и лиганда рецептора LDL.

20. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-19, где липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгированы посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

21. Средство на основе двухцепочечной iRNA по любому из пп.1-20, где 3'-конец смысловой цепи защищен концевым колпачком, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, при этом указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолинила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

22. Способ снижения экспрессии целевого гена в клетке, предусматривающий приведение указанной клетки в контакт со средством на основе двухцепочечной iRNA, содержащим антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену и содержит фосфат или имитатор фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи;

смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и

один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи,

где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₄-C₁₈-углеводородную цепь,

один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положениями 4-8 и 13-18 смысловой цепи и положениями 6-10 и 15-18 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

23. Способ по п.22, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи посредством линкера или носителя.

24. Способ по п.22, где липофильный фрагмент дополнительно содержит функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

25. Способ по п.22, где клетка представляет собой клетку, находящуюся за пределами печени.

26. Способ по п.22, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₁₆-углеводородную цепь.

27. Способ снижения экспрессии целевого гена у субъекта, предусматривающий введение субъекту средства на основе двухцепочечной iRNA, содержащего

антисмысловую цепь, которая комплементарна целевому гену и содержит фосфат или имитатор фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи;

смысловую цепь, которая комплементарна указанной антисмысловой цепи; и

один или несколько липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи,

где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C₄-C₁₈-углеводородную цепь,

один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими из следующих внутренних положений: положениями 4-8 и 13-18 смысловой цепи и положениями 6-10 и 15-18 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

28. Способ по п.27, где один или несколько липофильных фрагментов конъюгированы с одним или несколькими внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи посредством линкера или носителя.

29. Способ по п.27, где липофильный фрагмент дополнительно содержит функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

30. Способ по п.29, где средство на основе двухцепочечной iRNA вводят внепеченочным путем.

31. Способ по п.30, где средство на основе двухцепочечной iRNA вводят интратекальным путем.

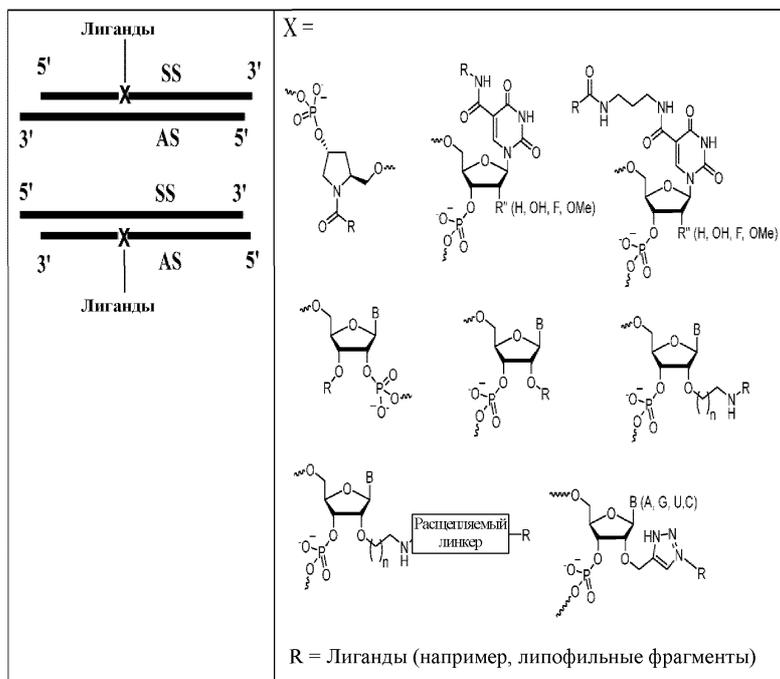
32. Способ по п.31, где способ обеспечивает снижение экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга.

33. Способ по п.32, где ткань головного мозга или спинного мозга выбрана из группы, состоящей из ткани коры головного мозга, мозжечка, шейного отдела спинного мозга, поясничного отдела спинного мозга и грудного отдела спинного мозга.

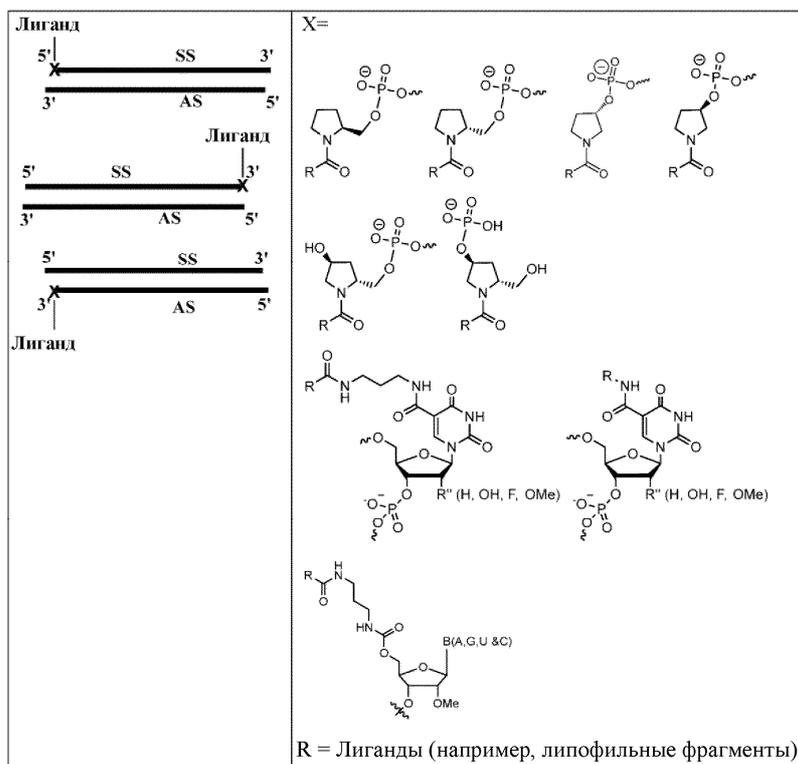
34. Способ по п.30, где целевой ген выбран из группы, состоящей из APP, ATXN2, C9orf72, TARDBP, MAPT(Tau), HTT, SNCA, FUS, ATXN3, ATXN1, SCA1, SCA7, SCA8, MeCP2, PRNP, SOD1, DMPK и TTR.

35. Способ лечения субъекта, страдающего нарушением ЦНС, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного средства для RNAi по любому из пп.1-21, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

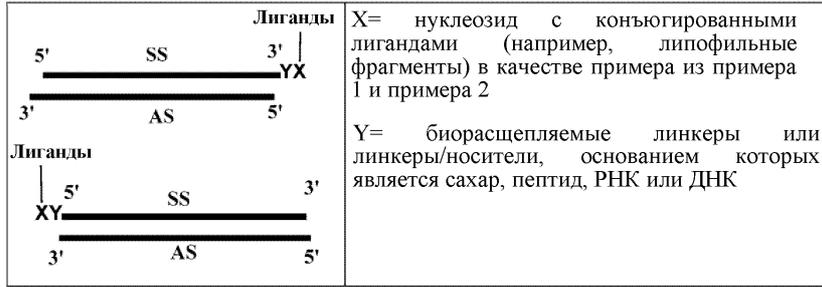
36. Способ по п.35, где нарушение ЦНС выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (ALS), лобно-височной деменции, болезни Хантингтона, болезни Паркинсона, спиноцеребеллярного, прионного нарушения и болезни Лафора.



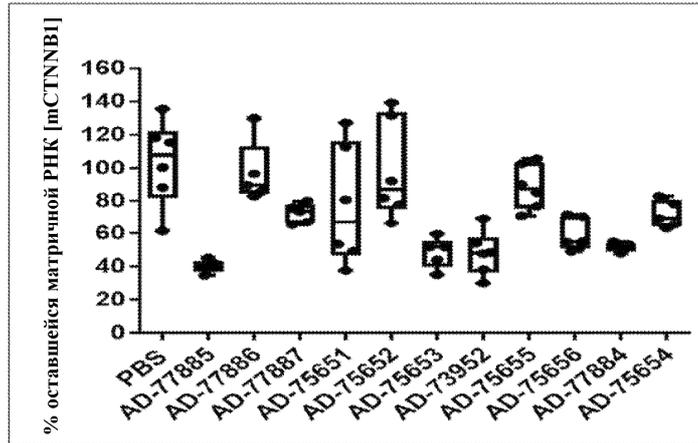
Фиг. 1



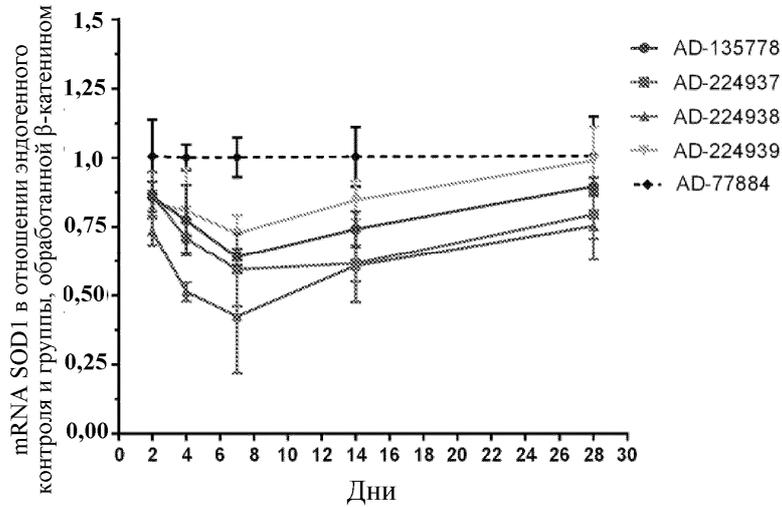
Фиг. 2



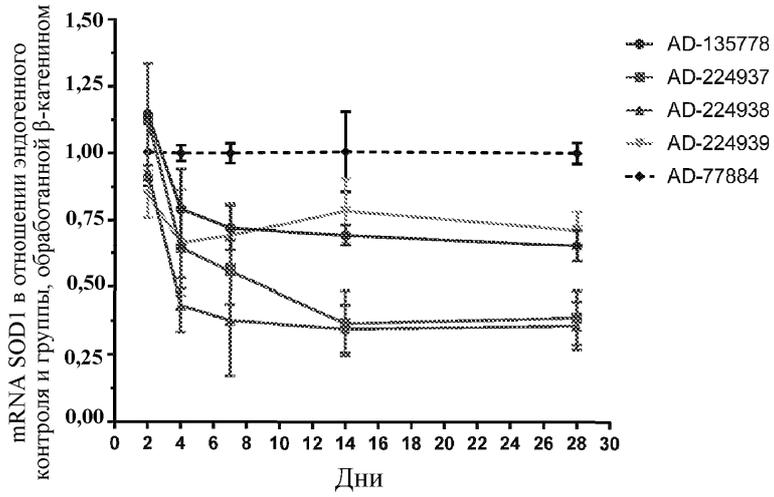
Фиг. 3



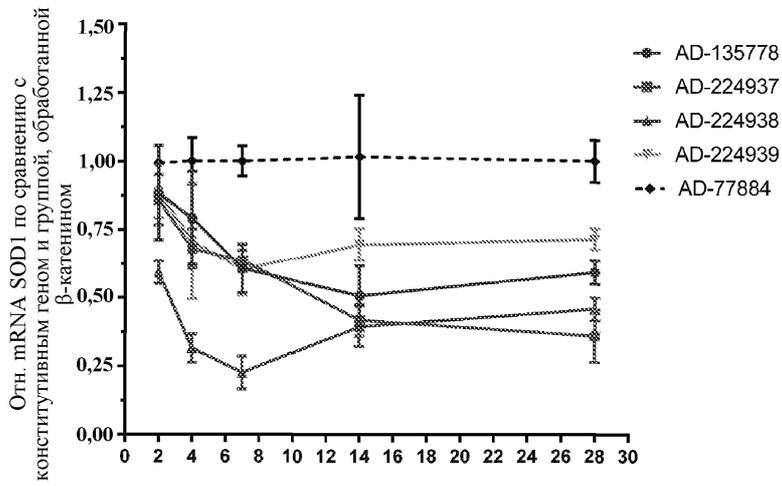
Фиг. 4



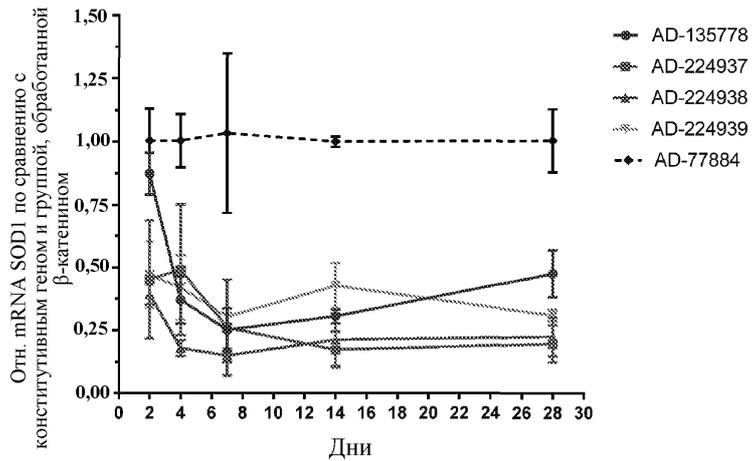
Фиг. 5



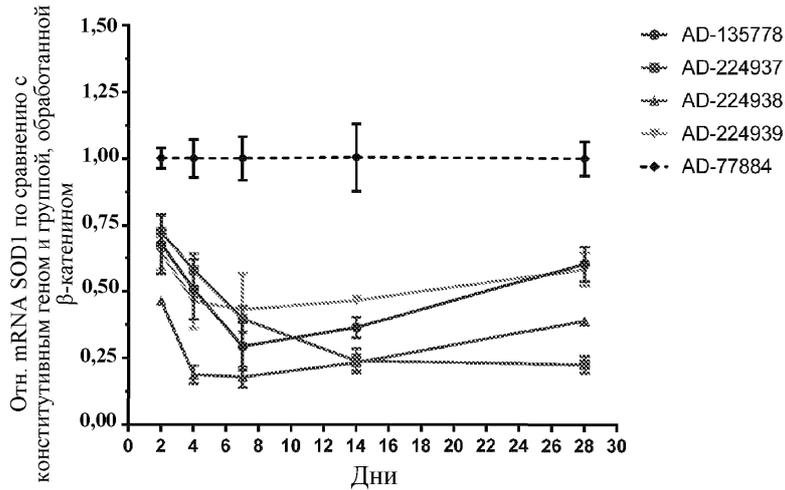
Фиг. 6



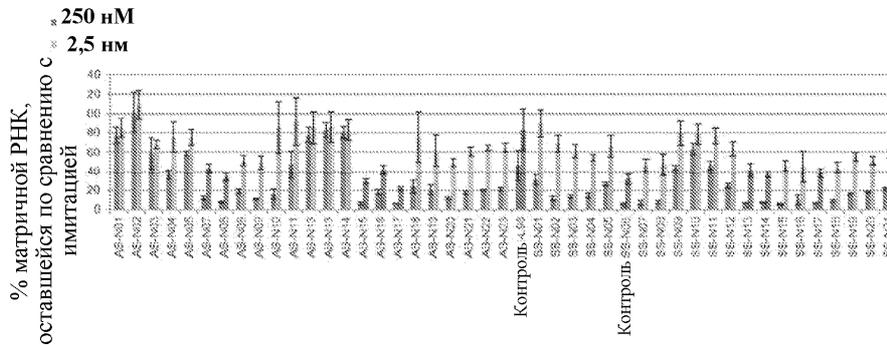
Фиг. 7



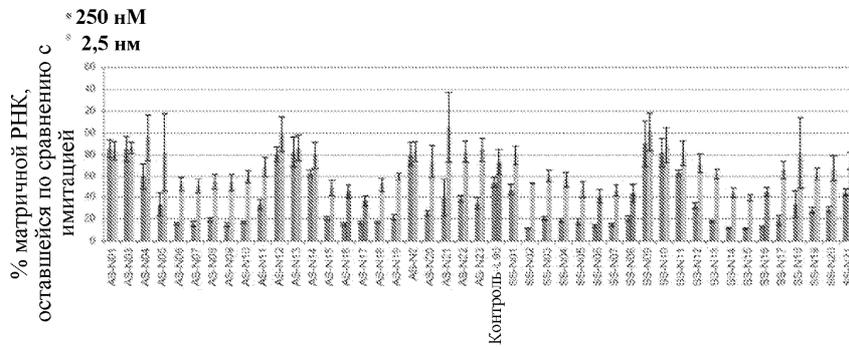
Фиг. 8



Фиг. 9



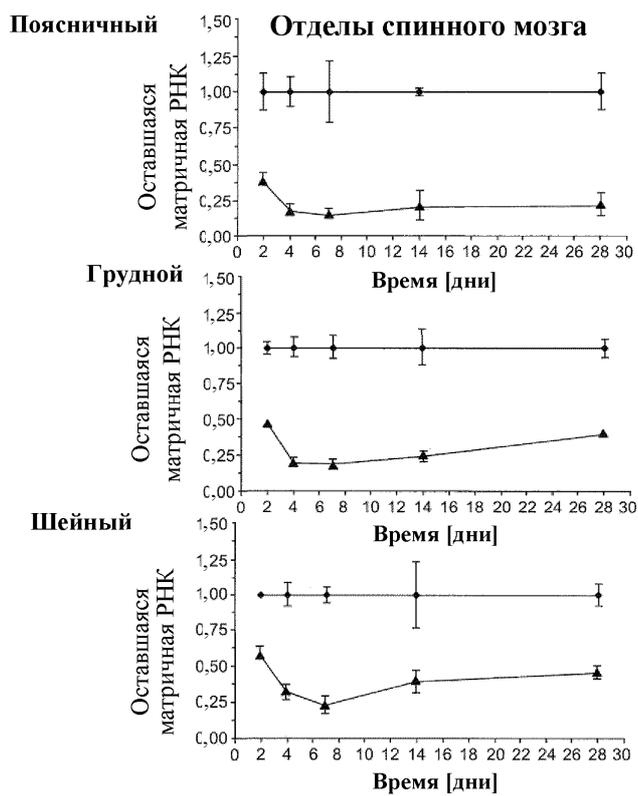
Фиг. 10



Фиг. 11



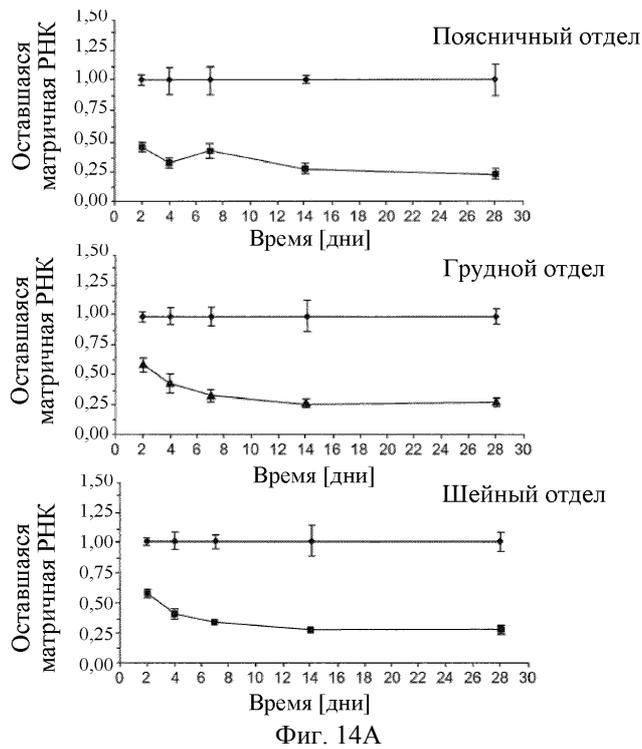
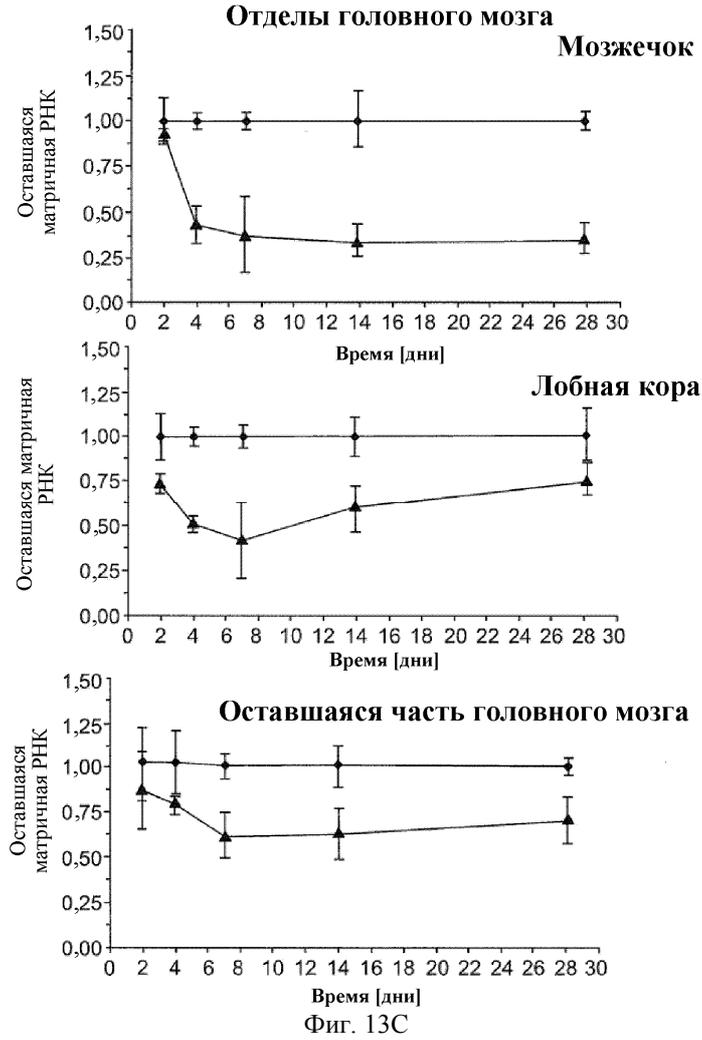
Фиг. 12

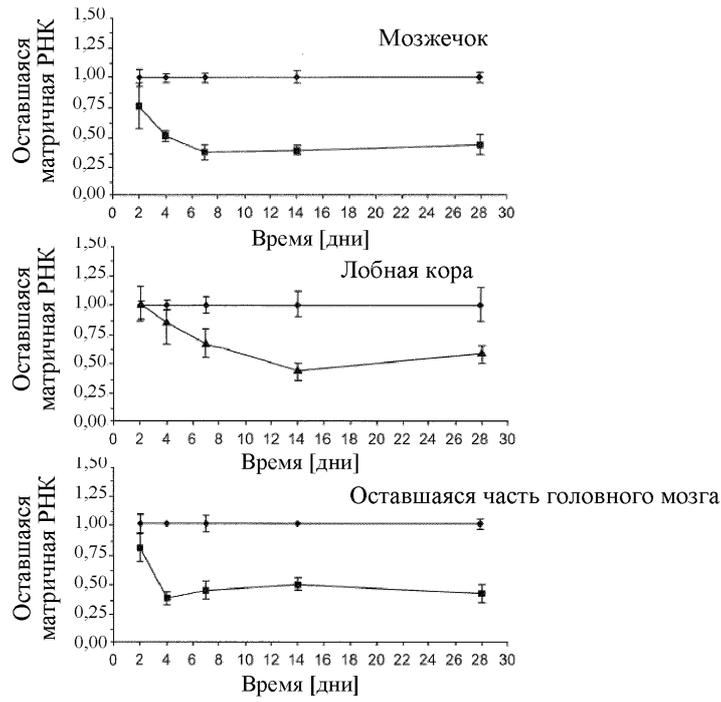


Фиг. 13А

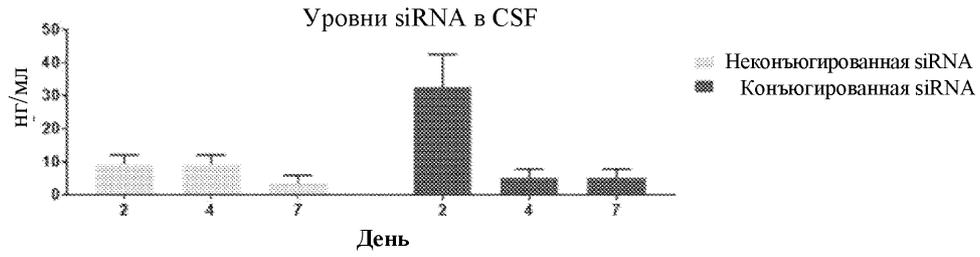


Фиг. 13В

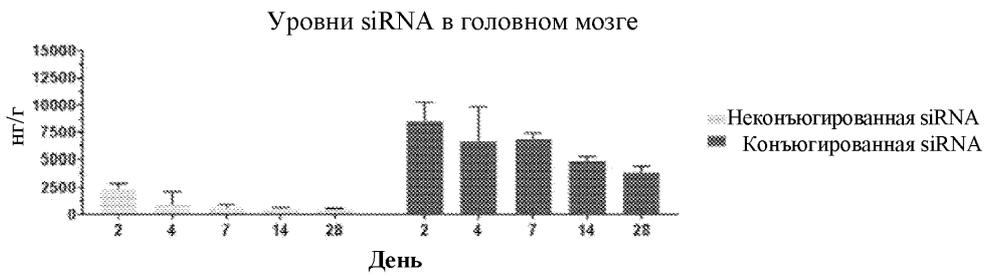




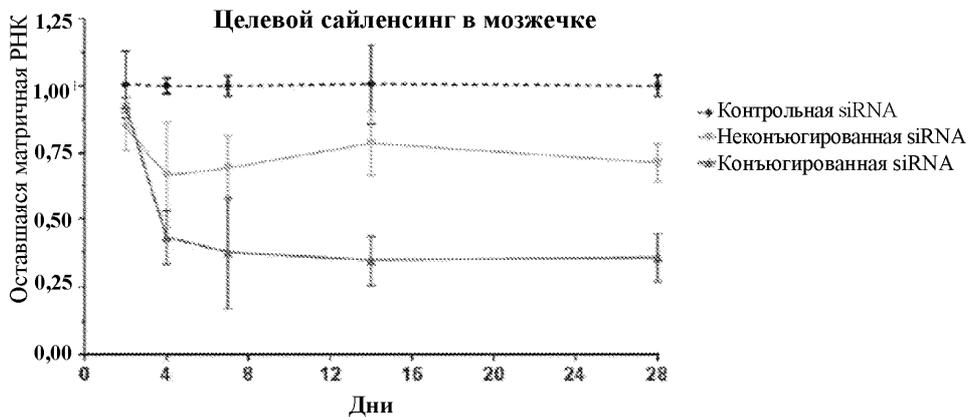
Фиг. 14В



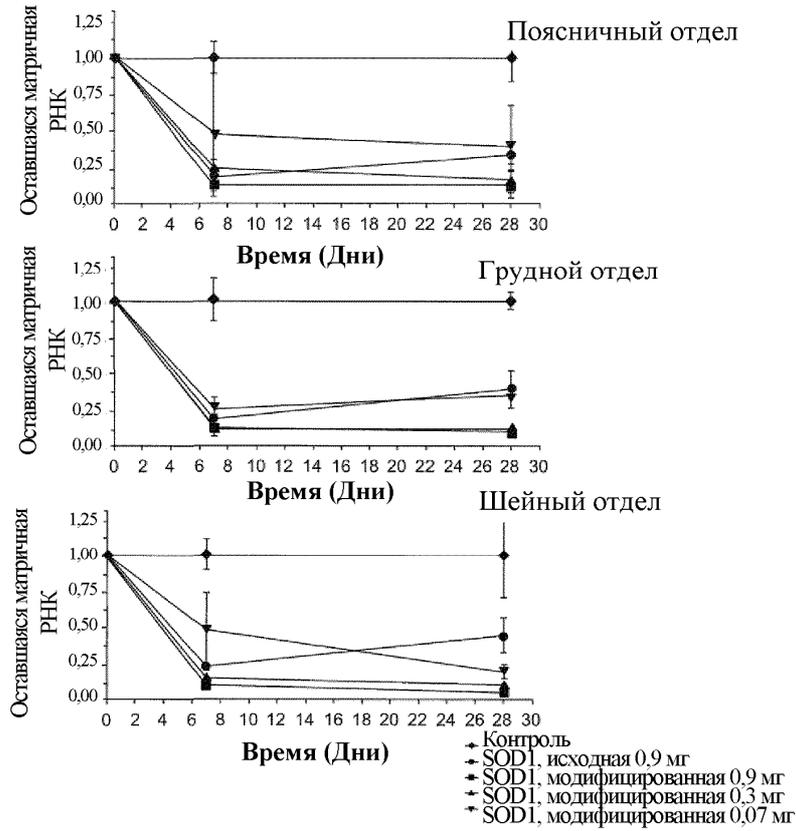
Фиг. 15А



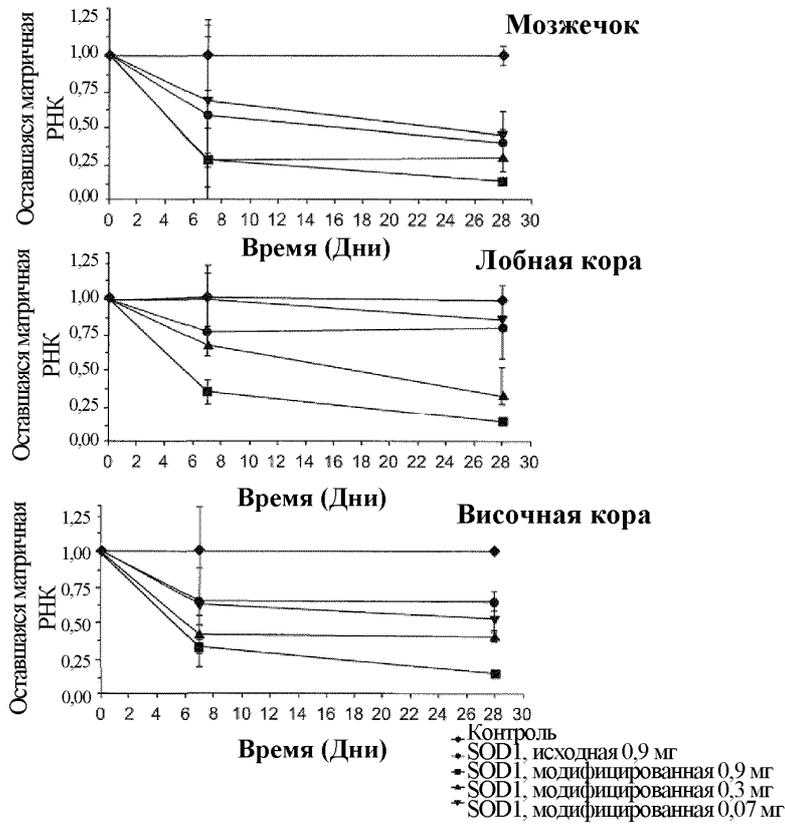
Фиг. 15В



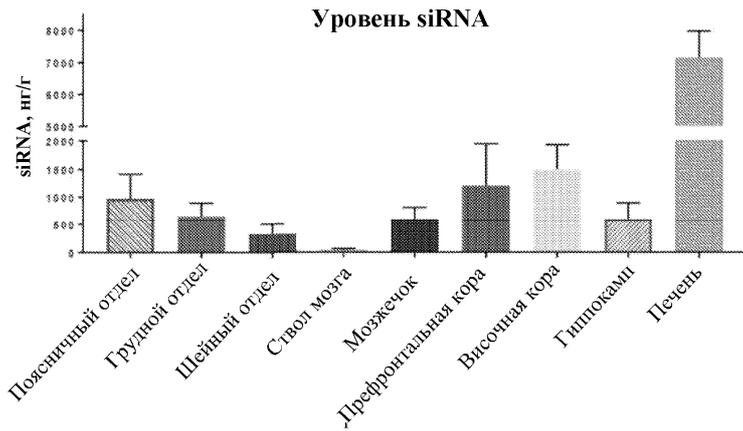
Фиг. 15С



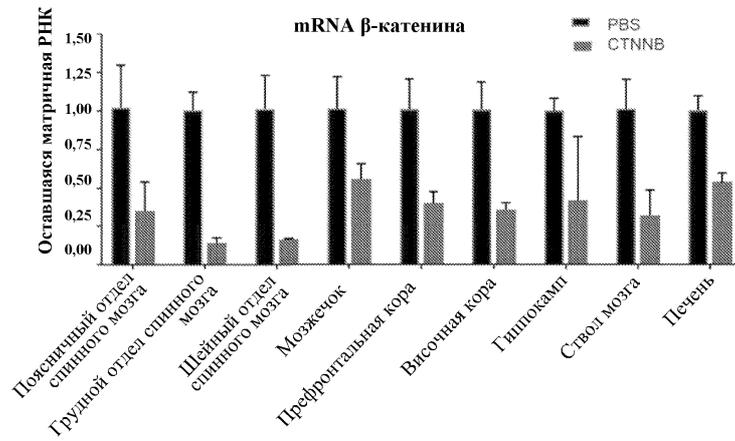
Фиг. 16А



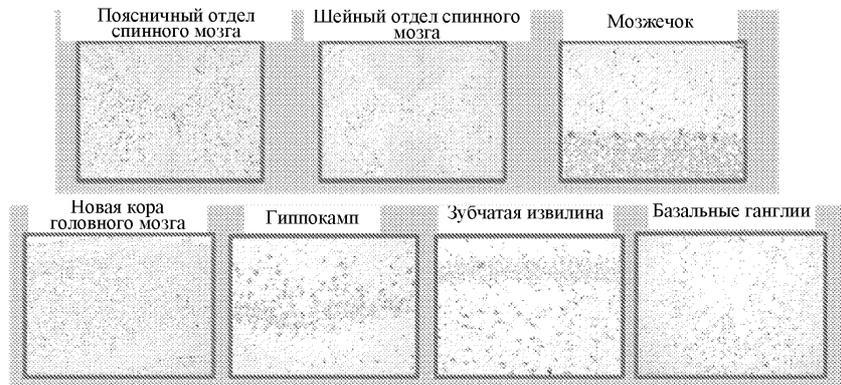
Фиг. 16В



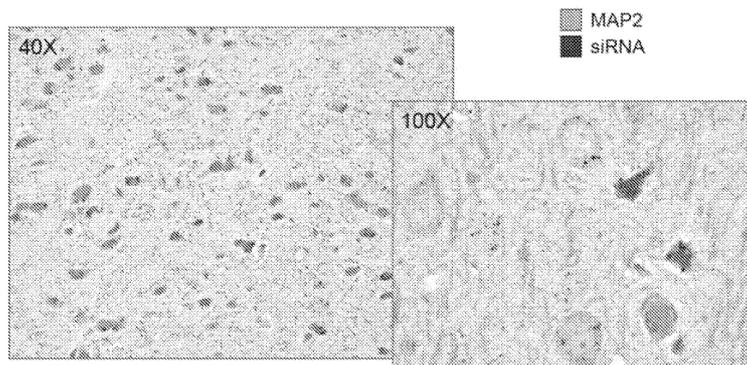
Фиг. 17



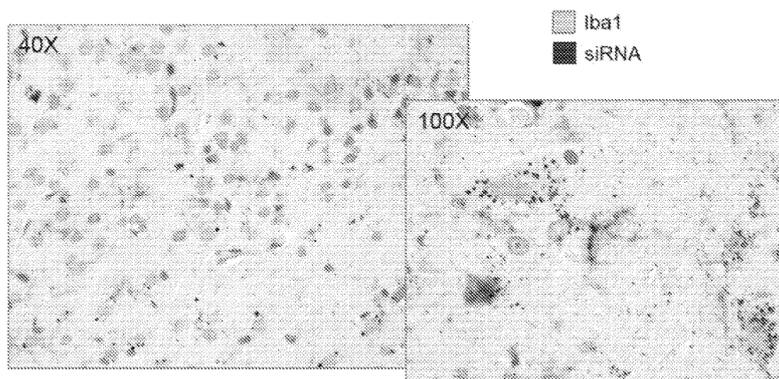
Фиг. 18



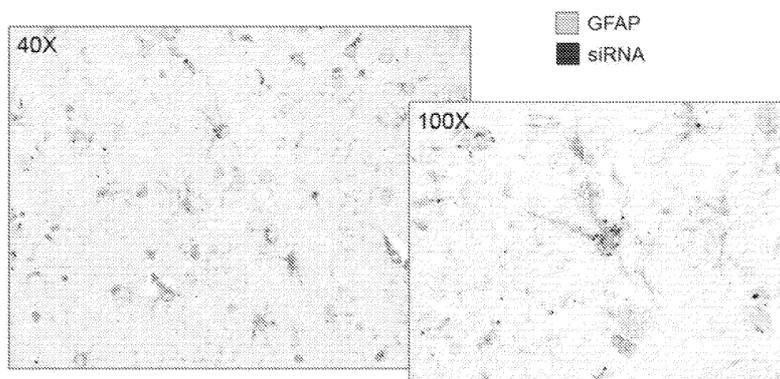
Фиг. 19



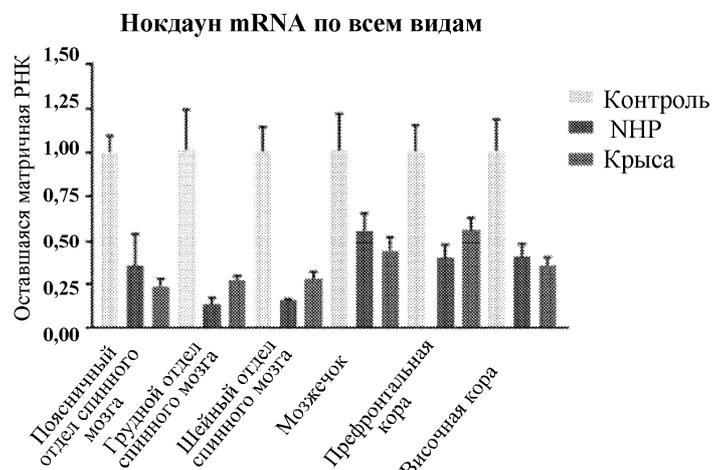
Фиг. 20



Фиг. 21

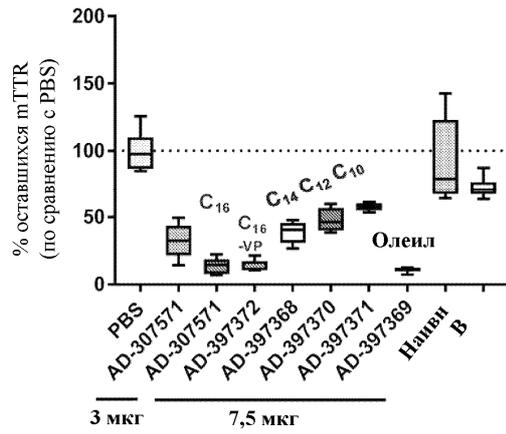


Фиг. 22



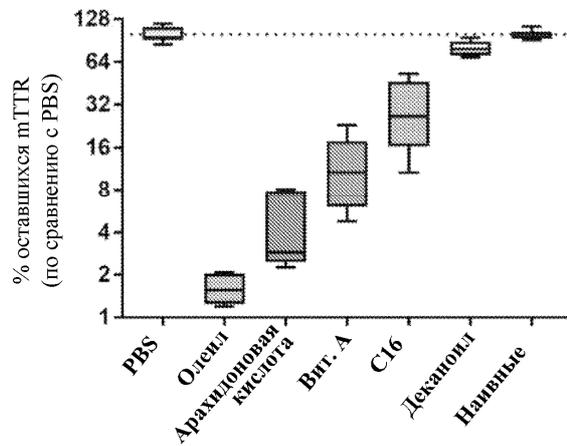
Фиг. 23

Уровни mRNA TTR в глазу на 14 день (7,5 мкг)



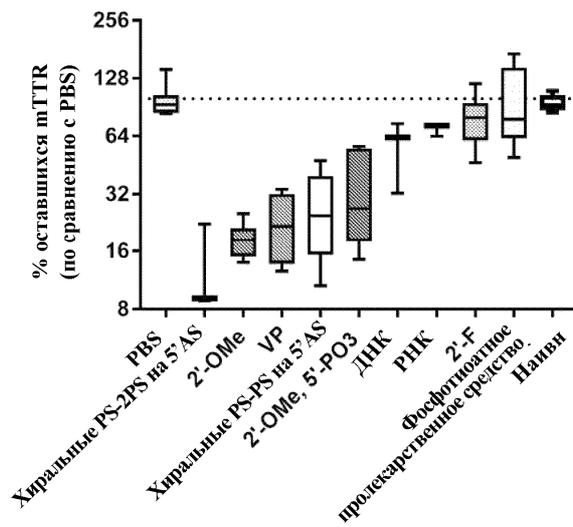
Фиг. 24

Уровни mRNA TTR в глазу на 14 день (7,5 мкг)



Фиг. 25

mTTR в глазу - 7,5 мкг IVT 14 день



Фиг. 26

