



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2010139908/10**, **21.10.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.10.2005

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

22.10.2004 US 60/621,552**14.06.2005 US 11/151,893****14.06.2005 US 11/151,976**Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:**2007115097 21.10.2005**(43) Дата публикации заявки: **10.04.2012** Бюл. № 10(45) Опубликовано: **10.10.2013** Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US2003203868 A1**, **30.10.2003**. **WO9714792**
A2, **24.04.1997**. **VIRA BITKO et al.**, **Phenotypic**
silencing of cytoplasmic genes using sequence-
specific double-stranded short interfering RNA
and its application in the reverse genetics of
wild type negative-strand RNA viruses, **BMC**
Microbiology, **20 December 2001**, **Vol.1**, **p.p.1-11**.
EA 12573 B1, **30.10.2009**.

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спаская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

БАРИК Сайлен (US)

(73) Патентообладатель(и):

САУТ АЛАБАМА МЕДИКАЛ САЙЕНС
ФАУНДЕЙШН (US)

(54) ИРНК СРЕДСТВО ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЕЙ ВИРУСНОГО БЕЛКА, МРНК ИЛИ ТИТРА РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА В КЛЕТКЕ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и касается иРНК средства для снижения уровней вирусного белка, мРНК или титра респираторного синцициального вируса в клетке дыхательных путей индивидуума. Представленное иРНК средство содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, комплементарных гену Р

вируса RSV, а антисмысловая цепь имеет по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, комплементарных указанной смысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит 15 или более последовательных нуклеотидов последовательности, состоящей из нуклеотидов 1-19 последовательности SEQ ID NO:6. Изобретение может быть использовано при лечении респираторных заболеваний и получении вакцин против RSV. 7 з.п. ф-лы, 5 ил., 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006.01)**A61P 11/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010139908/10, 21.10.2005**(24) Effective date for property rights:
21.10.2005

Priority:

(30) Convention priority:

22.10.2004 US 60/621,552**14.06.2005 US 11/151,893****14.06.2005 US 11/151,976**Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:**2007115097 21.10.2005**(43) Application published: **10.04.2012 Bull. 10**(45) Date of publication: **10.10.2013 Bull. 28**

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

BARIK Sajlen (US)

(73) Proprietor(s):

**SAUT ALABAMA MEDIKAL SAJENS
FAUNDEJShN (US)****(54) IRNA AGENT FOR REDUCING LEVELS OF VIRAL PROTEIN, IRNA OR RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS TITRE IN RESPIRATORY CELL**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology, and concerns an iRNA agent for reducing the levels of viral protein, iRNA, or respiratory syncytial virus titre in an individual's respiratory cell. The present iRNA agent contains a sense chain and an antisense chain, wherein the above sense chain comprises at least 15 consecutive nucleotides

complementary to the gene P of the RSV virus, and the antisense chain comprises at least 15 consecutive nucleotides complementary to said sense chain, wherein said antisense chain comprises 15 or more consecutive nucleotides of a sequence consisting of nucleotides 1-19 of the sequence SEQ ID NO:6.

EFFECT: invention may be used in treating the respiratory diseases and preparing the RSV vaccines.

8 cl, 5 dwg, 1 tbl

Область техники

Изобретение относится к области лечения респираторных вирусных инфекций и к композициям и способам модуляции вирусной репликации и, в частности, к обратной регуляции экспрессии гена(ов) респираторного вируса олигонуклеотидами посредством РНК-интерференции, при местном введении в легкие и полость носа ингаляцией/интраназально или системно инъекцией/внутривенно.

Уровень техники

В силу своей природной функции дыхательные пути подвергаются воздействию множества возбудителей, поступающих воздушно-капельным путем, которые вызывают различные респираторные заболевания. Вирусная инфекция дыхательных путей является самой частой причиной госпитализации детей в развитых странах, подсчитано в США, что число госпитализаций составляет приблизительно 91000 стоимостью 300 миллионов долларов. Двумя основными возбудителями респираторных заболеваний являются респираторный синцитиальный вирус человека (RSV) и вирус парагриппа (PIV); вместе они инфицируют верхние и нижние дыхательные пути, вызывая круп, пневмонию и бронхиолит (Openshaw, P.J.M., *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Easton, A.J., et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004)). Только RSV инфицируют до 65% детей в течение первого года жизни и почти всех детей в течение первых двух лет. RSV также является важной причиной заболеваемости и смертности у пожилых. Иммуитет после инфекции RSV не является полным и долгосрочным и поэтому у всех возрастных групп возникают повторные инфекции. У грудных детей, перенесших вызванный RSV бронхиолит, повышен риск развития свистящего дыхания и астмы в более старшем возрасте. Поиски эффективного способа лечения и вакцины против RSV, продолжающиеся вот уже почти четыре десятилетия, дали скромные результаты (Openshaw, P.J.M., *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Maggon, K. et al, *Rev. Med. Virol.* 14,149-168 (2004)). В настоящее время нет ни одной клинически одобренной вакцины против RSV или PIV. Также существуют штаммы обоих вирусов, поражающие отличающихся от человека животных, таких как рогатый скот, козы, свиньи и овцы, вызывающие потери в сельском хозяйстве и мясомолочной промышленности (Easton, A.J., et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004)).

Как RSV, так и PIV содержат несегментированные геномы, состоящие из минус-цепи РНК, и принадлежат к семейству *Paramyxoviridae*. Профилактику и лечение затрудняет ряд особенностей этих вирусов. Вирусные геномы мутируют с высокой скоростью из-за отсутствия механизма исправления ошибок при репликации РНК-геномов, что создает значительные трудности для разработки надежной вакцины или противовирусного препарата (Sullender, W.M. *Clin. Microbiol. Rev.* 13,1-15 (2000)). Работы по созданию возможных ингибиторов слитого белка RSV (F) были прекращены частично из-за того, что вирус приобретает устойчивость благодаря мутациям, которые были картированы в гене F (Razinkov, V., et. al., *Antivir. Res.* 55,189-200 (2002), Morton, C.J. et al. *Virology* 311, 275-288 (2003)). Оба вируса связываются с клеточными белками, что создает дополнительные трудности для получения бесклеточного вирусного материала для вакцинации (Burke, E., et al., *Virology* 252,137-148 (1998), Burke, E., et al., *J. Virol* 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72,2655-2662 (1998)). Наконец, иммунология обоих вирусов, особенно RSV, крайне сложна (Peebles, R.S., Jr., et al., *Viral. Immunol.* 16, 25-34 (2003), Haynes, L.M., et al., *J. Virol.* 77,9831-9844 (2003)). Применение денатурированных белков RSV в качестве вакцин приводит к «иммунопотенцированию» или усилению тяжести заболевания (Polack, F.P. et al. *J.*

Exp. Med. 196, 859-865 (2002)), но этот феномен был исследован, ни исключено для PIV. Проблема в целом недооценивается из-за недавнего закрытия ряда биофармацевтических программ, направленных против RSV.

5 Геном RSV состоит из одноцепочечной минус-РНК, длина которой составляет 15222 нуклеотидов, и эта цепь дает одиннадцать основных белков (Falsey, A. R., and E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84). Два из этих белков, гликопротеины F (слияние) и G (прикрепление), являются основными поверхностными белками и наиболее важны для стимуляции защитного иммунитета. Белок SH (мелкий гидрофобный), белок М (матриксный) и белок М2 (22 кД) связаны с оболочкой вируса, но не вызывают защитный иммунный ответ. Обнаружено, что белки N (основной белок, связанный с нуклеокапсидом), Р (фосфопротеин) и L (основной полимеразный белок) связаны с РНК вириона. Два неструктурных белка, NS1 и NS2, по-видимому, участвуют во взаимодействии организма и вируса, но не присутствуют в 15 инфекционных вирионах.

Штаммы RSV человека разделяют на две основные группы - А и В. Показано, что наиболее дивергентным среди белков RSV является гликопротеин G. Полагают, что 20 вариативность гликопротеина G RSV между группами и внутри двух групп RSV играет важную роль в способности RSV ежегодно вызывать вспышки заболевания. Гликопротеин G состоит из 289-299 аминокислот (в зависимости от штамма RSV) и содержит внутриклеточную, трансмембранную и высокогликозилированную каркасную структуру массой 90 кД, а также домены, связывающие гепарин. Гликопротеид существует в секретируемой и связанной с мембраной формах.

25 Успешные способы лечения инфекции RSV в настоящее время неизвестны (Maggon and Barik, 2004, *Reviews in Medical Virology* 14:149-68). Инфекция нижних дыхательных путей, вызванная RSV, в большинстве случаев проходит сама. Не существует окончательных указаний или критериев, касающихся лечения, госпитализации и 30 выписки детей с данной инфекцией. Для устранения гипоксии, которая может возникнуть на фоне инфекции, вызванной RSV, может использоваться подача кислорода через носовую канюлю. Искусственная вентиляция легких у детей с дыхательной недостаточностью, шоком или рецидивной асфиксией может снизить летальность. Некоторые врачи назначают стероиды. Однако несколько исследований 35 показали, что у детей, госпитализированных с бронхиолитом, лечение стероидами не влияет на течение заболевания. Таким образом, кортикостероиды, в отдельности или в сочетании с бронхолитическими средствами, неэффективны при лечении бронхиолита у больных, у которых нет сопутствующих заболеваний и которые не находятся на ИВЛ. Стероиды также использовались у детей с сопутствующими заболеваниями 40 сердца и легких, такими как бронхолегочная дисплазия и астма.

С середины 1980-х годов для лечения детей с бронхиолитом, вызванным RSV, применяется рибавирин, аналог гуанозина с противовирусным действием, однако 45 многие исследования, в которых оценивалось применение рибавирина, дали противоречивые результаты. В большинстве центров рибавирин теперь применяется только у пациентов с иммунодефицитом и тяжелобольных.

При тяжелом бронхиолите, вызванном RSV, сывороточная концентрация ретинола низкая, однако испытания, проведенные на госпитализированных детях с 50 бронхиолитом, вызванным RSV, показали, что назначение витамина А не дает положительного эффекта. В терапевтических испытаниях, в которых больным с инфекцией нижних дыхательных путей вводили 1500 мг/кг иммуноглобулина против RSV внутривенно или 100 мг/кг иммуноглобулина против RSV ингаляционно,

тоже не удалось зарегистрировать существенных положительных эффектов.

В развитых странах лечение инфекции нижних дыхательных путей, вызванных RSV, как правило, ограничено симптоматическим лечением. Противовирусную терапию обычно проводят только в ситуациях, опасных для жизни, из-за ее высокой стоимости и отсутствия единого мнения об эффективности. В развивающихся странах основным средством лечения служит кислород (там, где он доступен), и единственным способом снизить летальность является профилактика.

РНК-интерференция или «RNAi» - термин, впервые введенный Fire и коллегами для описания наблюдения того, что двухцепочечная РНК (dsRNA) при введении червям может блокировать экспрессию генов (Fire *et al*, *Nature* 391:806-811, 1998).

Короткая dsRNA контролирует геноспецифический посттранскрипционный сайленсинг у многих организмов, включая позвоночных, и представляет новый инструмент для изучения функции генов. RNAi была предложена в качестве способа создания нового класса терапевтических средств. Однако до настоящего времени большинство этих предположений остаются лишь предложениями, и не было доказано, что RNAi может использоваться в лечебных целях.

Таким образом, существует необходимость в безопасных и эффективных вакцинах против RSV, особенно для детей. Также существует необходимость в терапевтических средствах и способах лечения инфекции, вызванной RSV, в любом возрасте и у людей с иммунодефицитом. Также существует необходимость в научных методах для характеристики защитного иммунного ответа на RSV для возможности изучения патогенеза заболевания и облегчения создания терапевтических средств и вакцин. Настоящее изобретение преодолевает недостатки существующего уровня техники, предлагая способы и композиции, эффективно модулирующие или предотвращающие инфекции, вызванные RSV и PIV, которые могут быть распространены на другие респираторные вирусы. Конкретно, настоящее изобретение вносит вклад в развитие данной области техники, предлагая iRNA-средства, которые, как показано, снижают уровни RSV и PIV *in vivo*, и демонстрируя терапевтическое действие данного класса молекул. Кроме того, показана возможность одновременного лечения более чем одного вируса.

Выводы

Настоящее изобретение основано на *in vivo* доказательстве возможности ингибирования RSV и PIV при интраназальном введении RNAi-средств, а также парентерального введения таких средств. Кроме того, показано, что эффективное снижение титра вируса при одновременном применении двух различных iRNA-средств может достигаться для более чем одного вируса. На основании этих данных настоящее изобретение относится к общим и конкретным композициям и способам, которые могут использоваться для снижения уровней мРНК RSV или PIV, уровней белка RSV или PIV и титров вируса RSV и PIV у индивидуума, например млекопитающего, такого как человек. Эти данные могут быть применены к другим респираторным вирусам.

Настоящее изобретение конкретно относится к iRNA-средствам, состоящим из или содержащих по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов одного из генов RSV, PIV или другого респираторного вируса, в особенности гена Р RSV или PIV и генов N, G, F, SH, M и L RSV. iRNA-средство предпочтительно содержит в цепи менее 30 нуклеотидов, например 21-23 нуклеотида. Двухцепочечное iRNA-средство может либо иметь тупые концы либо, более предпочтительно, липкие концы из 1-4 нуклеотидов на одном или обоих 3'-концах средства.

Кроме того, iRNA-средство может содержать только природные субъединицы рибонуклеотида или может быть синтезированным и содержать таким образом одну и более модификаций сахара или основания у одной и более субъединиц рибонуклеотида, которые включены в средство. iRNA-средство может быть
 5 дополнительно модифицировано для соединения с лигандом, например холестерином, который выбран для улучшения стабильности, распределения или захвата клетками средства. iRNA-средства могут дополнительно находиться в изолированной форме или могут являться частью фармацевтической композиции, используемой в способах,
 10 описанных в настоящем документе, в особенности фармацевтической композиции, приготовленной для доставки в легкие или полость носа, или для парентерального введения. Фармацевтические композиции могут содержать одно и несколько iRNA-средств и в некоторых вариантах осуществления будут содержать два и более iRNA-средств, каждое из которых направленно против отличающегося респираторного
 15 вируса, такого как RSV и PIV.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к способу снижения уровня в клетке мРНК RSV, PIV или мРНК другого респираторного вируса. В способах по настоящему изобретению используются клеточные механизмы, участвующие в РНК-интерференции, которые селективно разрушают вирусную мРНК в клетке, и
 20 предусматривающие стадию контакта клетки с одним из противовирусных iRNA-средств по настоящему изобретению. Такие способы могут быть выполнены непосредственно в клетке или могут быть выполнены на индивидууме-млекопитающем путем введения индивидууму одного из iRNA-средств/фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Снижение
 25 вирусной мРНК в клетках приводит к снижению количества образующихся вирусных белков и в организме приводит к уменьшению титра реплицирующегося вируса. В разделе примеры эти способы продемонстрированы для PIV и RSV, но эти способы
 30 могут быть распространены на другие респираторные вирусы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам снижения в клетке уровней мРНК двух и более респираторных вирусов, где каждая мРНК поступает от различного вируса. В настоящих методах используют клеточные механизмы, вовлеченные в РНК-интерференцию, которые достигают селективного разрушения
 35 вирусной мРНК двух различных вирусов в клетке, и предусматривающие стадию контакта клетки с двумя противовирусными iRNA-средствами по настоящему изобретению. Такие способы могут быть осуществлены непосредственно в клетке или могут быть осуществлены на индивидууме-млекопитающем путем введения
 40 индивидууму у двух iRNA-средств по настоящему изобретению. Снижение в клетках вирусной мРНК двух различных вирусов приводит к снижению количества образующихся вирусных белков, и в организме приводит к уменьшению титра обоих реплицирующихся вирусов. В разделе примеры это доказано для PIV и RSV и одновременного введения iRNA-средств. Этот вариант осуществления настоящего
 45 изобретения может быть применен к любым двум респираторным вирусам.

Способы и композиции по изобретению, например способы и композиции iRNA могут использоваться с любой дозировкой и/или композицией, описанной в настоящем документе, а также с любым путем введения, описанным в настоящем
 50 документе. Особенно важно, что в настоящем документе было продемонстрировано интраназальное введение iRNA-средства и его способности ингибировать репликацию вируса в респираторных тканях. Эти данные могут быть применены к другому респираторному вирусу, например PIV, как показано в примерах, и к другим путям

местной доставки в легкие, например ингаляции/распылению.

Детали одного и более вариантов осуществления данного изобретения сформулированы ниже в сопровождающих чертежах и описании. Другие особенности, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из настоящего описания, 5 чертежей и формулы изобретения. Заявка охватывает все цитированные ссылки, патенты и заявки на патент путем включения их в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

Краткое описание чертежей

10 Фигура 1. Титрование противовирусных siRNA *ex vivo*. (a) Иммуноблоттинг всех белков клеток A549, зараженных RSV (*ex vivo*), с профилином в качестве внутреннего контроля. Цифры в рамке представляют уровни мРНК-мишени Р после лечения siRNA, выраженные в виде процентов от уровней без лечения. В следующих трех группах вирус вводили через 4 часа после siRNA. (b) Легочный инфекционный вирус у мышей, 15 зараженных RSV (n=8 для каждого результата). (c) Легочный инфекционный вирус у мышей, зараженных HPIV3 (n=8 для каждого результата). (d) То же, что и в (b), за исключением того, что была введена «голая» siRNA без реактива для трансфекции. Звездочками отмечено статистически значимое ингибирование (P<0,05). siRNA описаны в таблице 1. 20

Фигура 2. Снижение количества вирусных антигенов в мышинных легких, леченных siRNA, без активации IFN. (a) Вирус был введен через 4 часа после siRNA, и вирусные антигены были обнаружены методом непрямой иммуногистохимии легких через 4 дня после заражения (зеленый - RSV; красный - HPIV3). (1) имитация 25 заражения, обработка антителами к Р RSV; (2-6) зараженные RSV, обработка антителами к Р RSV; (7, 8) зараженные HPIV3, обработка антителами к HPIV3. Использовали следующие siRNA (5 нмоль - 70 мкг): (1, 2) ничего; (3) siRNA#1 плюс реактив TransIT-ТКО; (4) siRNA#1 без реактива; (5) отрицательный контроль: siRNA плюс TransIT-ТКО; (6) luc-siRNA плюс TransIT-ТКО; (7) ничего; (8) siRNA#4 30 плюс TransIT-ТКО. Характерные ткани легкого были изъяты через 5 дней после заражения. Полоса=400 мкм. (b) Антисмысловая цепь siRNA#1 была обнаружена Нозерн-блоттингом различных количества общей РНК легкого через 2 дня после введения siRNA, с использованием меченной ДНК Р RSV в качестве зонда. Зонд 35 против NS1 RSV не реагировал, доказывая специфичность обнаружения. (c) Интраназально введенная siRNA (10 нмоль или 140 мкг на мышь) не активировала легочный IFN типа I (IFN- α) или типа II (IFN- γ) выше порога обнаружения (~10 пг/мл), тогда как в контрольных легких RSV-инфекция активизировала тип II и низкие уровни 40 типа I. Дорожки: 1 - siRNA#1; 2 - siRNA#4; 3 - Luc siRNA; 4 - отсутствие siRNA, но заражение RSV (показана величина ошибки). Легкие были изъяты через 2 дня после введения siRNA и через 4 дня после заражения (n=4 для каждого графика), (d) siRNA-опосредованное ингибирование смешанной инфекции, вызванной RSV и HPIV3, определенное методом непрямой иммуногистохимии (зеленый - RSV; красный - 45 HPIV3). (1, 5) отсутствие siRNA; (2, 6) siRNA#1, 5 наномоль (70 мкг); (3, 7) siRNA#4, 5 наномоль (70 мкг); (4, 8) siRNA#1 и siRNA#4, 5 наномоль каждой. (1-4) обработаны антителами к Р RSV; (5-8) обработаны антителами к HPIV3. Вирус был введен через 4 часа после siRNA, и ткани легкого были исследованы через 4 дня после заражения. 50 Полоса=400 мкм.

Фигура 3. Конкурентное ингибирование вируса высокой концентрацией siRNA при смешанной инфекции, вызванной RSV и HPIV3. (a) ПЦР в реальном времени (*ex vivo*); (b) иммуноблоттинг (*ex vivo*); (c) легочный иммуноблоттинг с козлиными антителами

к вирусу. Интенсивность полосы, соответствующая вирусному белку N, была определена количественно и выражена как процент в пробах легких, нелеченных siRNA. Вирус вводили через 4 часа после siRNA, и ткани легкого изымали через 5 дней после заражения (n=4 для каждого результата). Черный график - RSV; 5 белый график - HPIV3. Стандартные ошибки, как показано.

Фигура 4. Ослабление патологии легких и снижение маркера астмы у мышей, леченных siRNA#1. (a) Частота дыхания; (b) Легочная гистопатология; (c) Лейкотриен. $P < 0,002$ во всех анализах; n=4 для каждого результата; показана величина стандартной 10 ошибки. Вирус был введен через 4 часа после siRNA (70 мкг). Мыши, леченные отрицательным контролем siRNA, были неотличимы от нелеченных siRNA (данные не показаны).

Фигура 5. Лечебный эффект siRNA при заболевании, вызванном RSV. Изменения (a) массы тела и (b) титра вируса в легких во время RSV-инфекции у мышей. Показана 15 величина стандартной ошибки; n=6 для каждого результата. Стрелки указывают день введения siRNA (70 мкг).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Для простоты описания в настоящем документе для ссылки на одну и более 20 мономерных субъединиц РНК-средства иногда используется термин «нуклеотид» или «рибонуклеотид». Подразумевается, что использование термина «рибонуклеотид» или «нуклеотид» в настоящем документе может, в случае модифицированной РНК или заместителя нуклеотида, также относиться к модифицированному нуклеотиду или замещающему остатку, как далее описано ниже, в одном и более положениях.

«РНК-средство», как используется в настоящем документе, представляет собой 25 немодифицированную РНК, модифицированную РНК или заместители нуклеозидов, все из которых описаны в настоящем документе или известны в данной области техники синтетической РНК. Хотя описано множество модифицированных РНК и заместителей нуклеозидов, предпочтительные примеры включают те из них, которые 30 обладают более высокой устойчивостью к расщеплению нуклеазами, чем немодифицированные РНК. Предпочтительные примеры включают те из них, у которых имеется модификация 2'-сахара, модификация выступа единственной цепи, предпочтительно 3'-выступа единственной цепи, или, особенно у одноцепочечных, 5'-модификацию, которая затрагивает одну и более фосфатных групп или один и более 35 аналогов фосфатной группы.

«iRNA-средство» иногда называемое «RNAi-средством» (сокращение для «интерферирующего РНК-средства»), как используется в настоящем документе, 40 представляет собой РНК-средство, которое может обратно регулировать экспрессию гена-мишени, например, RSV. Не желая быть связанным теорией, iRNA-средство может действовать согласно одному или более из многих механизмов, включающих посттранскрипционное расщепление мРНК-мишени, иногда называемое в данной области техники RNAi, или претранскрипционные или претрансляционные 45 механизмы. iRNA-средство может содержать одну цепь или может содержать более одной цепи, например iRNA-средство может быть двухцепочечным (ds) iRNA-средством. Если iRNA-средство одноцепочечное, особенно предпочтительно, чтобы оно содержало 5'-модификацию, которая затрагивает одну и более фосфатную группу 50 или один или более аналогов фосфатной группы.

«Одноцепочечное iRNA-средство», как используется в настоящем документе, представляет собой iRNA-средство, которое состоит из единственной молекулы. Оно может содержать sdвоенную область, возникшую за счет образования пар внутри

цепи, например оно может представлять собой или содержать шпилечную структуру или структуру в форме ручки сковородки. Одноцепочечные iRNA-средства предпочтительно являются антисмысловыми по отношению к молекуле-мишени.

«ds iRNA-средство» (сокращение для «двухцепочечного iRNA-средства»), как используется в настоящем документе, представляет собой iRNA-средство, которое содержит более одной и, предпочтительно, две цепи, в которых межцепочечная гибридизация может образовать область с дуплексной структурой.

Изолированные iRNA-средства, описанные в настоящем документе, включая ds iRNA-средства, и siRNA средства, могут опосредовать сайленсинг гена-мишени, например, посредством деградации РНК. Для удобства такая РНК также указывается в настоящем документе как РНК, подвергающаяся сайленсингу. Такой ген также упоминается как ген-мишень. Предпочтительно, чтобы РНК, подвергающаяся сайленсингу, являлась генным продуктом эндогенного гена RSV.

Как используется в настоящем документе, фраза «опосредует RNAi» относится к способности средства вызывать, специфичным для последовательности образом, сайленсинг гена-мишени. «Сайленсинг гена-мишени» означает процесс, посредством которого клетка, в отсутствие контакта со средством содержащая и/или секретирующая определенный продукт гена-мишени, после контакта со средством будет содержать и/или секретировать по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% меньше такого генного продукта, по сравнению с подобной клеткой, которая не контактировала со средством. Таким продуктом гена-мишени может, например, быть матричная РНК (мРНК), белок или регуляторный элемент.

В противовирусных применениях по настоящему изобретению сайленсинг гена-мишени приведет к снижению «титра вируса» в клетке. Как используется в настоящем документе, «снижение титра вируса» относится к уменьшению количества жизнеспособного вируса, произведенного клеткой или обнаруженного в организме, которые подвергаются сайленсингу гена-мишени вируса. Снижение клеточного количества полученного вируса предпочтительно приведет к уменьшению количества измеримого вируса, произведенного в тканях объекта, подвергнутого лечению, и снижению тяжести симптомов вирусной инфекции. iRNA-средства по настоящему изобретению также упоминаются «как противовирусные iRNA-средства».

Как используется в настоящем документе, «ген RSV» относится к любому из генов, идентифицированных в вирусном геноме RSV (см. Falsey, A. R., and E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84). Эти гены известны в данной области техники и включают гены F, G, SH, M, N, P и L.

Как используется в настоящем документе, «ген PIV» относится к любому из генов, идентифицированных в вирусном геноме PIV (См. GenBank Accession # NC_001796). Эти гены известны в данной области техники и включают гены N, P, C, D, V, M, F, HN и L.

Как используется в настоящем документе, «респираторный вирус» относится к вирусам, которые реплицируются в клетках дыхательной системы. Такие вирусы включают, но не ограничены RSV, PIV, вирусом гриппа, метапневмовирусом, аденовирусом и коронавирусом (таким как SARS).

Как используется в настоящем документе, термин «комплементарный» используется, чтобы показать достаточную степень такой комплементарности, что между соединением по изобретению и молекулой РНК-мишени, например RSV, PIV или другой молекулой мРНК респираторного вируса, происходит стабильное и специфичное связывание. Специфичное связывание нуждается в достаточной степени

комплементарности, чтобы избежать неспецифического связывания олигомерного соединения с последовательностями, отличающимися от мишени, при условиях, в которых специфичное связывание желаемо, то есть при физиологических условиях в случае *in vivo* анализов или терапевтического лечения, или в случае *in vitro* анализов, в условиях, при которых анализы выполняются. Последовательности, отличающиеся от мишеней, типично отличаются по меньшей мере 4 нуклеотидами.

Как используется в настоящем документе, iRNA-средство «достаточно комплементарно» РНК-мишени, например мРНК-мишени (например, мРНК-мишени RSV или PIV), если iRNA-средство уменьшает образование белка, кодируемого РНК-мишенью в клетке. iRNA-средство также может быть «строго комплементарным» (исключая SRMS, содержащего субъединицу (субъединицы)) РНК-мишени, например, РНК-мишень и iRNA-средство отжигают, предпочтительно чтобы образовать гибрид, сделанный исключительно из пар оснований Уотсона-Крика в области строгой комплементарности. «Достаточно комплементарное» iRNA-средство может содержать внутреннюю область (например, по меньшей мере 10 нуклеотидов), которая строго комплементарна вирусной РНК-мишени. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления iRNA-средство специфично распознает отличие в один нуклеотид. В этом случае iRNA-средство опосредует RNAi только в том случае, когда область (например, в пределах 7 нуклеотидов), отличающаяся одним нуклеотидом, обладает строгой комплементарностью. Предпочтительные iRNA-средства будут основаны на смысловых и антисмысловых последовательностях, представленных в примерах, или состоять из таких последовательностей или содержать их.

Как используется в настоящем документе, «по существу идентичный», если используется обращение к первой нуклеотидной последовательности в сравнении со второй нуклеотидной последовательностью, означает, что первая нуклеотидная последовательность идентична второй нуклеотидной последовательности, за исключением одной, двух или трех нуклеотидных замен (например, замены аденозина на урацил).

Как используется в настоящем документе, «индивидуум» относится к организму млекопитающего, подвергающемуся лечению по поводу расстройства, опосредованного экспрессией вируса, такой как RSV- или PIV-инфекция, или подвергающемуся лечению профилактически, чтобы предотвратить вирусную инфекцию. Индивидуум может представлять собой любое млекопитающее, такое как примат, корова, лошадь, мышь, крыса, собака, свинья, коза. В предпочтительном варианте осуществления индивидуумом является человек.

Как используется в настоящем документе, лечение RSV-инфекции, PIV-инфекции, или другой инфекции, вызванной респираторным вирусом, относится к улучшению любых биологических или патологических параметров, которые 1) частично опосредованы наличием у индивидуума вируса и 2) на результат которых можно влиять путем снижении уровня присутствующего вирусного белка.

Как используется в настоящем документе, «совместное введение» относится к введению индивидууму двух и более средств, и, в частности, двух и более iRNA-средств. Средства могут содержаться в одной фармацевтической композиции и вводиться в одно и то же время или средства могут содержаться в отдельных композициях и вводиться индивидууму последовательно. Пока эти два средства могут обнаруживаться у индивидуума в одно и то же время, эти два средства называются применяемыми совместно.

Поскольку сайленсинг, опосредованный iRNA-средством, после применения

композиции iRNA-средства может сохраняться в течение нескольких дней, во многих случаях композицию можно вводить с частотой менее одного раза в сутки, или, в некоторых случаях, только один раз за весь терапевтический режим.

Конструирование и выбор iRNA-средств

Настоящее изобретение основано на демонстрации прицельного генного сайленсинга гена респираторного вируса *in vivo* после локального введения в легкие и носовую полость iRNA-средства или посредством интраназального введения/ингаляции, или системно/парентерально посредством инъекции и результирующего лечения вирусной инфекции. Настоящее изобретение дополнительно распространяется на применение iRNA-средств более чем к одному респираторному вирусу и лечению обеих вирусных инфекций путем совместного введения двух и более iRNA-средств.

Основываясь на этих результатах, изобретение конкретно относится к iRNA-средству, которое может использоваться в лечении вирусной инфекции, в частности, вызванной респираторными вирусами, и, в частности, RSV- или PIV-инфекции, в изолированной форме и в виде фармацевтической композиции, описанной ниже. Такие средства будут содержать смысловую цепь, имеющую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, которые комплементарны вирусному гену, и антисмысловую цепь, имеющую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, которые комплементарны последовательностям смысловой цепи. Особенно применимы iRNA-средства, которые содержат нуклеотидную последовательность гена белка Р RSV или PIV. Другие гены-мишени RSV включают гены F, G, SH, М, N и L. Другие гены PIV включают гены N, Р, С, D, V, М, F, HN и L. Средства, служащие примерами, представлены в таблице 1.

Кандидаты в iRNA-средства могут быть сконструированы путем выполнения, например, шагового генного анализа вирусных генов, которые будут служить мишенью iRNA. Могут создаваться и тестироваться перекрывающиеся, прилегающие или находящиеся вблизи средства-кандидаты, соответствующие всей или некоторой части транскрибируемой области. Каждое из iRNA-средств может быть протестировано и оценено по способности к обратной регуляции экспрессии гена-мишени (см. ниже «Оценка кандидата в iRNA-средства»).

iRNA-средство может быть рационально сконструировано, основываясь на информации о последовательности и желаемых характеристиках. Например, iRNA-средство может быть сконструировано в соответствии с относительной температурой плавления дуплекса-кандидата. В целом, дуплекс должен иметь более низкую температуру плавления 5'-конца антисмысловой цепи, чем 3'-конца антисмысловой цепи.

Соответственно, настоящее изобретение относится к iRNA-средствам, содержащим смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых содержит последовательность длиной по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 23 нуклеотида, которая по существу идентична, как определено выше, части гена респираторного вируса, особенно генам белка Р RSV или PIV. Примерами служат iRNA-средства, которые включают те, которые содержат 15 последовательных нуклеотидов одного из средств, предоставленных в таблице 1.

Длина антисмысловой цепи iRNA-средства должна составлять не менее 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 или 50 нуклеотидов. Ее длина должна составлять не более 50, 40 или 30 нуклеотидов. Предпочтительные диапазоны длины составляют 15-30, 17-25, 19-23 и 19-21 нуклеотид. В нескольких вариантах осуществления средство будет содержать 15

нуклеотидов одного из средств, приведенных в таблице 1.

Длина смысловой цепи iRNA-средства должна быть равна или быть не менее 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40 или 50 нуклеотидов. Ее длина должна быть равна или быть не более 50, 40 или 30 нуклеотидов. Предпочтительными диапазонами длины являются 15-30, 17-25, 19-23 и 19-21 нуклеотид. В нескольких вариантах осуществления средство будет содержать 15 нуклеотидов одного из средств, приведенных в таблице 1.

Длина двухцепочечной части iRNA-средства должна быть равна или быть не менее 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 или 50 нуклеотидных пар. Ее длина должна быть равна или быть не более 50, 40 или 30 пар нуклеотидов. Предпочтительными диапазонами длины являются 15-30, 17-25, 19-23 и 19-21 пару нуклеотидов.

Средства, представленные в таблице 1, имеют длину каждой цепи 21 нуклеотид. iRNA-средства содержат двухцепочечную область размером 19 нуклеотидов и выступ на каждом 3'-конце размером 2 нуклеотида. Эти средства могут быть модифицированы, как описано в настоящем документе, чтобы получить эквивалентные средства, содержащие по меньшей мере часть этих последовательностей и/или модификации оснований и связей олигонуклеотидов.

В целом, iRNA-средства по настоящему изобретению содержат область достаточной комплементарности с геном вируса, например белка P RSV или PIV, и достаточной длины, исходя из количества нуклеотидов, так что iRNA-средство или его фрагмент может опосредовать обратное регулирование специфического вирусного гена. Антисмысловые цепи iRNA-средств по настоящему изобретению предпочтительно полностью комплементарны последовательностям мРНК вирусного гена, в настоящем документе - белку P RSV и PIV. Однако абсолютной комплементарности iRNA-средства и мишени не требуется, но соответствие должно быть достаточным, чтобы позволить iRNA-средству или продукту его расщепления управлять специфичным для последовательности сайленсингом, например, посредством RNAi-расщепления мРНК RSV.

Таким образом, iRNA-средства по настоящему изобретению охватывают средства, содержащие смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых содержит последовательность по меньшей мере из 16, 17 или 18 нуклеотидов, которая по существу идентична, как определено ниже, одной из последовательностей вирусного гена, в частности белка P RSV или PIV, за исключением того, что не более 1, 2 или 3 нуклеотидов в цепи, соответственно, замещены другими нуклеотидами (например аденозин замещен урацилом), при этом по существу сохраняется способность ингибировать экспрессию RSV в культивируемых клетках человека, как определено ниже. Эти средства будут, таким образом, содержать по меньшей мере 15 нуклеотидов, идентичных одной из последовательностей вирусного гена, особенно гена белка P RSV или PIV, за исключением 1, 2 или 3 оснований, не совпадающих с последовательностью вирусной мРНК-мишени или отличающихся между смысловой и антисмысловой цепью. Несовпадения с последовательностью вирусной мРНК-мишени, в частности в антисмысловой цепи, более допустимы в терминальных областях, и если они присутствуют, то предпочтительно находятся в терминальной области или областях, например, в пределах 6, 5, 4 или 3 нуклеотидов с 5'- и/или 3'-конца, наиболее предпочтительно в пределах 6, 5, 4 или 3 нуклеотидов с 5'-конца смысловой цепи или 3'-конца антисмысловой цепи. Необходимо, чтобы смысловая цепь была только достаточно комплементарной антисмысловой цепи, чтобы поддержать общий двухцепочечный характер молекулы.

Предпочтительно, чтобы смысловая и антисмысловая цепь были выбраны такими, чтобы у одного или обоих концов молекулы iRNA-средства находилась одноцепочечная или неспаренная область, такая как представленные в таблице 1. Таким образом, iRNA-средство содержит смысловую и антисмысловую цепь, предпочтительно спаренные так, чтобы содержать выступ, например один или два 5'-или 3'-выступа, но предпочтительно 3'-выступ из 2-3 нуклеотидов. Большинство вариантов осуществления будет иметь 3'-выступ. У предпочтительных siRNA средств будут одноцепочечные выступы, предпочтительно 3'-выступ длиной 1-4 или предпочтительно 2 или 3 нуклеотида, у одного или обоих концов iRNA-средства. Выступы могут образоваться в результате того, что одна цепь длиннее другой, или в результате того, что обе цепи одинаковой длины расположены уступом. Предпочтительно 5'-концы фосфорилированы.

Предпочтительная длина дуплексной области составляет от 15 до 30, наиболее предпочтительно 18, 19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотида, например, в диапазоне siRNA-средств, который обсуждался выше. Также включены варианты осуществления, в которых две цепи siRNA средства связаны, например ковалентно связаны. Также в объем изобретения включена шпилька или другие одноцепочечные структуры, которые создают необходимую двухцепочечную область и предпочтительно 3'-выступ.

Оценка кандидата в iRNA-средства

Кандидат в iRNA-средства может оцениваться по его способности к обратной регуляции экспрессии гена-мишени. Например, кандидат в iRNA средства может быть получен и приведен в контакт с клеткой, например клеткой человека, которая была заражена или будет заражена вирусом, представляющим интерес, например вирусом, содержащим ген-мишень. Альтернативно, клетка может трансфицироваться конструкцией, на которой экспрессируется вирусный ген-мишень, таким образом устраняя потребность в модели инфекционности вируса. Уровень экспрессии гена-мишени до и после контакта с кандидатом в iRNA-средства может сравниваться, например, по мРНК, уровню белка или титру вируса. Если определено, что количество РНК, белка или вируса, экспрессируемого геном-мишенью, после контакта с iRNA-средством более низок, то может быть заключено, что iRNA-средство обратно регулирует экспрессию гена-мишени. Уровень вирусной РНК-мишени или вирусного белка в клетке или титр вируса в клетке или ткани может быть определен любым желаемым способом. Например, уровень РНК-мишени может быть определен Нозерн-блоттингом, полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (RT-PCR), методом разветвленной ДНК или методом защиты от РНКазы. Уровень белка может быть определен, например, Вестерн-блоттингом или иммуофлюоресценцией. Титр вируса может быть определен по формированию бляшек.

Тестирование стабильности, модификация и повторное тестирование iRNA-средств

Кандидат в iRNA средства может оцениваться на предмет стабильности, например восприимчивости к расщеплению эндонуклеазой или экзонуклеазой, такому, которое наблюдается при введении iRNA-средства в организм индивидуума. Могут использоваться методы, чтобы идентифицировать сайты, которые восприимчивы к модификации, особенно расщеплению, например расщеплению компонентом, обнаруженным в организме индивидуума.

Если сайты, восприимчивые к расщеплению, идентифицированы, может быть разработано и/или синтезировано дополнительное iRNA-средство, в котором потенциальный сайт расщепления сделан устойчивым к расщеплению, например

введением 2'-модификаций в сайт расщепления, например 2'-О-метил группы. Это дополнительное iRNA-средство может повторно проверяться на стабильность, и данный процесс может повторяться до тех пор, пока не будет найдено iRNA-средство, проявляющее желаемую стабильность.

5 Тестирование *in vivo*

У iRNA-средства, идентифицированного, как способное ингибировать экспрессию гена RSV, могут быть проверены функциональные возможности *in vivo* на животной модели (например, на млекопитающем, таком как мышь или крыса), как показано в примерах. Например, iRNA-средство может быть введено животному, и iRNA-средство

оценено на предмет его биораспределения, стабильности и способности ингибировать экспрессию вирусных генов, например RSV или PIV, или снижать титр вируса. iRNA-средство может быть введено непосредственно к ткани-мишени, например, инъекцией, или iRNA-средство может быть введено животной модели тем же способом, каким оно было бы введено человеку. Как показано в настоящем документе, средство

может предпочтительно вводиться ингаляцией как средство лечения вирусной инфекции. iRNA-средство также может быть оценено на предмет его внутриклеточного распределения. Оценка может подразумевать определение того, поступило ли iRNA-средство в клетку. Оценка также может включать определение стабильности (например, периода полужизни) iRNA-средства. Оценка iRNA-средства *in vivo* может быть облегчена при использовании iRNA-средства, конъюгированного с прослеживаемым маркером (например, флуоресцентным маркером, таким как флюоресцеин; радиоактивной меткой, такой как ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P или ^3H ; частицами золота; или частицами антигена для иммуногистохимии).

iRNA-средство, применимое для отслеживания биораспределения, может недостаточно активно вызывать сайленсинг генов *in vivo*. Например, iRNA-средство может быть нацелено на ген, отсутствующий у животного (например, мишенью iRNA-средства, введенного мышью, может быть люцифераза), или iRNA-средство может иметь нонсенс-последовательность, которая не нацелена на какой-либо ген, например любой эндогенный ген.

За локализацией/биораспределением iRNA можно следить, например, с помощью прослеживаемой метки, прикрепленной к iRNA-средству, такой как прослеживаемое вещество, описанное выше.

У iRNA-средства может быть оценена его способность к обратной регуляции экспрессии гена вируса. Уровни экспрессии гена вируса *in vivo* могут быть измерены, например, гибридизацией *in situ* или выделением РНК из ткани до и после воздействия iRNA-средства. Там, где животное необходимо умертвить для получения ткани, для сравнения будет использоваться контрольное животное, не получившее лечения. Вирусная мРНК-мишень может быть обнаружена любым желаемым способом, включая, но не ограничиваясь RT-PCR, Нозерн-блоттингом, методом разветвленной ДНК или методом защиты от РНКазы. Альтернативно или в дополнение за экспрессией гена вируса можно следить, выполняя Вестерн-блоттинг с экстрактами ткани, обработанной iRNA-средством. Титр вируса может быть измерен с помощью подсчета БОЕ (бляшкообразующих единиц).

50 Химия iRNA

Описанные в настоящем документе отдельные iRNA-средства представляют, например, молекулы РНК (двухцепочечные; одноцепочечные), которые опосредуют RNAi, чтобы ингибировать экспрессию вирусного гена, например белка

P RSV или PIV.

РНК-средства, обсуждающиеся в настоящем документе, включают немодифицированную в других отношениях РНК, а также РНК, которые были модифицированы, например, с тем, чтобы улучшить эффективность, и полимеры заместителей нуклеозидов. Немодифицированная РНК относится к молекуле, в которой компоненты нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные остатки, те же самые или по существу те же самые, которые встречаются в природе, предпочтительно те, которые естественно встречаются в организме человека. В уровне техники содержатся упоминания редких или необычных, но встречающихся в природе РНК как модифицированных РНК, см. например, Limbach *et al*, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22: 2183-2196. Такие редкие или необычные РНК, которые часто называют модифицированными РНК (очевидно, потому что они, как правило, являются результатом посттранскрипционной модификации), остаются в пределах термина немодифицированная РНК, который используется в настоящем документе. Модифицированная РНК, как используется в настоящем документе, относится к молекуле, в котором и один и более компонентов нуклеиновой кислоты, а именно сахаров, оснований и фосфатных остатков, отличаются от природных, предпочтительно отличаются от встречающихся в организме человека. Хотя они называются модифицированными «РНК», вследствие модификации они будут, разумеется, содержать молекулы, которые не являются РНК. Заместители нуклеозидов представляют собой молекулы, в которых рибофосфатный каркас замещен не-рибофосфатной конструкцией, которая позволяет основаниям находиться в корректных пространственных отношениях, таких что гибридизация является по существу сходной с той, которая наблюдается при рибофосфатном каркасе, сюда относятся, например, незаряженные имитаторы рибофосфатного каркаса. Примеры каждого из приведенного выше обсуждаются в настоящем документе.

Модификации, описанные в настоящем документе, могут быть встроены в любую двухспиральную РНК и подобную РНК молекулу, описанную в настоящем документе, например iRNA-средство. Может оказаться желательным изменить одну или обе, антисмысловую и смысловую, цепи iRNA-средства. Поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерами субъединиц или мономеров, многие из модификаций, описанных ниже, происходят в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, сюда относятся, например, модификации основания или фосфатного остатка или несвязанного с О фосфатного остатка. В некоторых случаях модификация произойдет во всех зависимых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих и фактически в большинстве случаев этого не будет. Например, модификация может произойти только в 3' или 5'-концевом положении, может произойти только в терминальной области, например в положении терминального нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может произойти в области двойной цепи, области одинарной цепи или в обеих. Например, фосфоротиоатная модификация в положении несвязанного О может произойти только по одному или обоим концам, может произойти только в терминальных областях, например, в положении терминального нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может произойти в областях двойной или одинарной цепи, особенно на концах. Сходным образом модификация может произойти в смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих. В некоторых случаях смысловая и антисмысловая цепь будут иметь одинаковые модификации или одинаковый класс модификаций, но в других случаях у смысловой и антисмысловой цепи будут различные модификации, например в

некоторых случаях может оказаться желательным изменить только одну цепь, например смысловую цепь.

Две главные цели для введения модификаций в iRNA-средства - их стабилизация против разложения в биологических средах и улучшение фармакологических свойств, например фармакодинамических свойств, которые далее обсуждаются ниже. Другие подходящие модификации сахара, основания или каркаса iRNA-средства описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ No. РСТ/US2004/01193, поданной 16 января 2004 года. iRNA-средство может содержать основание, не встречающееся в природе, такое как основания, описанные в находящейся в совместном владении заявке РСТ No. РСТ/US2004/011822, поданной 16 апреля 2004 года. iRNA-средство может содержать не встречающийся в природе сахар, такой как неуглеводная циклическая молекула носителя. Типовые особенности не встречающегося в природе сахара для применения в средствах iRNA описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ No. РСТ/US2004/011829, поданной 16 апреля 2003 года.

iRNA-средство может содержать межнуклеотидную связь (например, хиральную фосфоротиоатную связь), применимую для повышения устойчивости к нуклеазам. Кроме того, или в качестве альтернативы для увеличения устойчивости к нуклеазам iRNA-средство может содержать имитатор рибозы. Типовые межнуклеотидные связи и имитаторы рибозы для увеличения устойчивости к нуклеазам описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ No. РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 года.

iRNA-средство может содержать конъюгированные с лигандом субъединицы мономера и мономеры для синтеза олигонуклеотидов. Типовые мономеры описаны в находящейся в совместном владении заявке на патент США No. 10/916185, поданной 10 августа 2004 года.

У iRNA-средства может быть структура ZXY, такая как описанная в находящейся в совместном владении заявке РСТ РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 года.

iRNA-средство может образовывать комплекс с амфифильным остатком. Типовые амфифильные остатки для применения с iRNA-средствами описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ No. РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 года.

В другом варианте осуществления iRNA-средство может образовывать комплекс со средством, которое отличается модульным комплексом. Комплекс может содержать средство-носитель, связанное с одним или более (предпочтительно с двумя или более, более предпочтительно со всеми тремя) из: (а) конденсирующего средства (например, средства, способного притягивать, например, связывать, нуклеиновую кислоту, например, посредством ионного или электростатического взаимодействия); (b) средства слияния (например, средства, способного сливаться и/или транспортироваться сквозь мембрану клетки); и (с) нацеливающей группы, например средства, нацеленного на клетку или ткань, например лектина, гликопротеида, липида или белка, например антитела, которое связывается с клетками определенного типа. iRNA-средства, образующие комплекс со средством доставки, описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ № РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 года.

iRNA-средство может образовывать неканонические соединения, такие как соединения между смысловой и антисмысловой последовательностями дуплекса iRNA. Типовые особенности неканонических iRNA-средств описаны в находящейся в совместном владении заявке РСТ № РСТ/US2004/07070, поданной 8 марта 2004 года.

Повышенная устойчивость к нуклеазам

iRNA-средство, например iRNA-средство, которое нацелено на RSV, может иметь

повышенную устойчивость к нуклеазам. Один из способов увеличить устойчивость заключается в том, чтобы определить сайты расщепления и изменить эти сайты с тем, чтобы ингибировать расщепление. Например, сайтами расщепления могут служить динуклеотиды 5'-UA-3', 5'-UG-3', 5'-CA-3', 5'-UU-3 или 5'-CC-3'.

Для увеличения устойчивости к нуклеазам и/или аффинности связывания с мишенью iRNA-средство, например смысловые и/или антисмысловые цепи iRNA-средства, может содержать, например, 2'-модифицированные единицы рибозы и/или фосфоротиоатные связи. Например, 2'-гидроксильные группы (ОН) могут быть модифицированы или заменены рядом различных «окси-» или «дезоксигрупп-» заместителей.

Примеры «окси-»-модификации 2'-гидроксильной группы включают алкокси или арилокси (OR, например, R=H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероалкил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; «запертые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил соединен, например, метиленовым мостиком с 4' атомом углерода того же сахара рибозы; O-AMINE (AMINE=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино) и аминоксиды, $O(CH_2)_nAMINE$, (например, AMINE=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин, полиамино). Заслуживает внимания, что олигонуклеотиды, содержащие только метоксиэтильную группу (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, производное PEG), проявляют устойчивость к нуклеазам, сравнимую с таковой модифицированных посредством робастной модификации фосфоротиоатом.

«Дезокси-»-модификации включают водород (например, сахара дезоксирибозы, которые имеют особую значимость для выступающих участков частично ds РНК); галоген (например, фтор); amino (например, NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINE$ (AMINE=NH₂; алкиламино, диалкиламино, гетероцикл, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино), -NHC(O)R (R=алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), циано; меркапто; алкил-тио-алкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые необязательно могут быть замещены, например, аминной функциональной группой. Предпочтительными заместителями служит 2'-метоксиэтил, 2'-OCH₃, 2'-O-аллил, 2'-C-аллил и 2'-фтор.

Чтобы максимизировать устойчивость к нуклеазам, 2'-модификации могут использоваться в комбинации с одной и более модификациями фосфатного линкера (например, фосфоротиоата). Так называемые химерные олигонуклеотиды представляют собой олигонуклеотиды, которые содержат две и более различные модификации.

В определенных вариантах осуществления все пиримидины iRNA-средства несут 2'-модификации и поэтому iRNA-средство имеет повышенную устойчивость к эндонуклеазам. Повышенной устойчивости к нуклеазам также можно достичь путем модификации 5'-нуклеотидов, которая дает в результате, например, по меньшей мере один 5'-уридин-аденин-3'-(5'-UA-3') динуклеотид, в котором уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; по меньшей мере один 5'-уридин-гуанин-3'-(5'-UG-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным нуклеотидом; по меньшей мере один 5'-цитидин-аденин-3'-(5'-CA-3') динуклеотид, где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом; по меньшей мере один 5'-уридин-уридин-3'-(5'-UU-3') динуклеотид, в котором 5'-уридин является 2'-модифицированным

нуклеотидом; или по меньшей мере один 5'-цитидин-цитидин-3'-(5'-CC-3') динуклеотид, где 5'-цитидин является 2'-модифицированным нуклеотидом. iRNA-средство может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5 таких динуклеотидов.

Включение сахара фуранозы в каркас олигонуклеотида также может уменьшить расщепление эндонуклеазами. iRNA-средство может быть дополнительно модифицировано путем включения 3'-катионной группы или путем инвертирования нуклеозида 3'-конца 3'-3'-связью. Согласно другой альтернативе, 3'-конец может быть заблокирован аминоалкильной группой, например 3'-C5-аминоалкил dT. Другие 3'-конъюгаты могут ингибировать 3'-5'-расщепление экзонуклеазами. Не будучи связанными теорией, 3'-конъюгат, такой как напроксен или ибупрофен, может ингибировать расщепление экзонуклеазами путем стерического блокирования связывания экзонуклеазы с 3'-концом олигонуклеотида. Даже малые алкильные цепи, арильные группы или гетероциклические конъюгаты, или модифицированные сахара (D-рибоза, дезоксирибоза, глюкоза и т.д.) могут блокировать 3'-5'-экзонуклеазы.

Сходным образом 5'-конъюгаты способны ингибировать 5'-3'-расщепление экзонуклеазами. Не будучи связанными теорией, 5'-конъюгат, такой как напроксен или ибупрофен, может ингибировать расщепление экзонуклеазами путем стерического блокирования связывания экзонуклеазы с 5'-концом олигонуклеотида. Даже малые алкильные цепи, арильные группы или гетероциклические конъюгаты, или модифицированные сахара (D-рибоза, дезоксирибоза, глюкоза и т.д.) могут блокировать 3'-5'-экзонуклеазы.

iRNA-средство может обладать повышенной устойчивостью к нуклеазам, если дуплексное iRNA-средство по меньшей мере на одном конце содержит одноцепочечный нуклеотидный выступ. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидный выступ содержит 1-4, предпочтительно 2-3 неспаренных нуклеотида. В предпочтительном варианте осуществления неспаренный нуклеотид одноцепочечного выступа, который непосредственно прилежит к терминальной паре нуклеотидов, содержит пуриновое основание, и терминальная нуклеотидная пара является парой G-C, или по меньшей мере два из последних четырех комплементарных нуклеотидных пар являются парами G-C. В дополнительно вариантах осуществления нуклеотидный выступ может иметь 1 или 2 неспаренных нуклеотида, и в типовом варианте осуществления нуклеотидный выступ представляет собой 5'-GC-3'. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидный выступ находится на 3'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления iRNA-средство содержит мотив 5'-CGC-3' на 3'-конце антисмысловой цепи, такой, что образуется 2-nt выступ 5'-GC-3'.

Таким образом, iRNA-средство может содержать мономеры, которые были модифицированы, чтобы ингибировать расщепление, например, нуклеазами, например, эндонуклеазами или экзонуклеазами, обнаруженными в организме индивидуума. Эти мономеры упоминаются в настоящем документе как NRM или мономеры, способствующие устойчивости к нуклеазам, или модификации. Во многих случаях эти модификации будут также влиять на другие свойства iRNA-средства, например на способность взаимодействовать с белком, например, транспортным белком, например сывороточным альбумином или членом RISC, или на способность первых и вторых последовательностей образовывать дуплекс друг с другом или образовывать дуплекс с другой последовательностью, например молекулой-мишенью.

Модификации, которые могут быть применимы для получения iRNA-средства,

которое отвечает предпочтительным критериям устойчивости к нуклеазам, обрисованным выше, могут предусматривать одну и более из следующих химических и/или стереохимических модификаций сахара, основания и/или фосфатного каркаса:

(i) хиральные (Sp) тиааты. Таким образом, предпочтительные NRM включают нуклеотидные димеры, обогащенные или чистые по определенной хиральной форме модифицированной фосфатной группы, содержащей гетероатом в положении, не образующем связи, например Sp или Rp, в положении X, которое является положением, обычно занятым кислородом. Атом в X может также быть S, Se, Nr_2 или Br_3 . Если X представляет собой S, предпочтительна обогащенная или хирально чистая Sp-связь. «Обогащенная» означает «содержащая по меньшей мере 70, 80, 90, 95 или 99% предпочтительной формы».

Такие NRM более подробно обсуждаются ниже:

(ii) присоединение одной и более катионных групп к сахару, основанию, и/или атому фосфора фосфата или модифицированного остатка фосфатного каркаса. Таким образом, предпочтительные NRM включают производные мономеров, замещенные в терминальном положении катионной группой. Поскольку 5'-конец антисмысловой последовательности должен оканчиваться -ОН или фосфатной группой, в этом NRM предпочтительно не используется 5'-конец антисмысловой последовательности.

Группа должна быть присоединена в положение основания, которое минимизирует интерференцию с образованием Н-связи и гибридизацией, например, вдали от стороны, которая взаимодействует с комплементарным основанием второй цепи, например, в положении 5' пиримидина или положении 7 пурина. Подробнее они обсуждаются ниже;

(iii) нефосфатные связи на концах. В соответствии с этим, предпочтительные NRM содержат нефосфатные связи, например связь из 4 атомов, которая придает более высокую устойчивость к расщеплению, чем фосфатная связь. Примеры включают 3' $\text{CH}_2\text{-NCH}_3\text{-O-CH}_2\text{-5'}$ -и 3' $\text{-CH}_2\text{-NH-(O=)-CH}_2\text{-5'}$;

(iv) 3'-соединения тиофосфатов и 5'-соединения тиофосфатов. В соответствии с этим, предпочтительные NRM могут содержать эти структуры;

(v) L-РНК, 2'-5'-связи, инвертированные связи, а-нуклеозиды. В соответствии с этим, другие предпочтительные NRM содержат: L нуклеозиды и димерные нуклеотиды, полученные из L-нуклеозидов; 2'-5'-фосфатные, нефосфатные и модифицированные фосфатные связи (например, тиофосфаты, фосфорамидаты и боронофосфаты); димеры, имеющие инвертированные связи, например 3'-3'-или 5'-5'-связи; мономеры, имеющие альфа-связь в 1' положении сахара, например структуры, описанные в настоящем документе и имеющие альфа-связь;

(vi) конъюгированные группы. В соответствии с этим, предпочтительные NRM могут содержать, например, нацеливающий остаток или конъюгированный лиганд, описанные в настоящем документе, конъюгированные с мономером, например, через сахар, основание или каркас;

(vi) неосновные связи. В соответствии с этим, предпочтительные NRM могут включать неосновный мономер, например неосновный мономер, который описан в настоящем документе (например, мономер, не содержащий нуклеинового основания); ароматический или гетероциклический, или полигетероциклический ароматический мономер, как описано в настоящем документе; и

(vii) 5'-фосфонаты и 5'-фосфатные пролекарства. В соответствии с этим, предпочтительные NRM содержат мономеры, предпочтительно в терминальном положении, например в 5'-положении, в которых один и более атомов фосфатной группы защищены защитной группой, и данная защитная группа или группы

удаляются в результате действия компонента в организме индивидуума, например карбоксиэстеразы или фермента, присутствующего в организме индивидуума. Например, фосфатное пролекарство, в котором карбоксиэстераза расщепляет защищенную молекулу, приводит к образованию тиаоатного аниона, который атакует атом углерода, соседний с О фосфата, что приводит к образованию незащищенного фосфата.

В iRNA-средство или в последовательность iRNA-средства может быть введена одна и более различных модификаций NRM. В последовательности или в средстве iRNA модификация NRM может использоваться более одного раза. Поскольку некоторые NRM вносятся в гибридизацию, общее число включенных в состав NRM должно быть таким, чтобы поддерживать приемлемые уровни образования дуплекса iRNA-средства.

В некоторых вариантах осуществления модификации NRM вводят в терминальный сайт расщепления или в область расщепления последовательности (смысловой цепи или последовательности), которая не нацелена на желаемую последовательность или ген индивидуума. Это позволяет уменьшить сайленсинг в отношении последовательностей, не являющихся мишенями.

Модификации, устойчивые к нуклеазам, включают некоторые, которые могут быть помещены только в конец, и другие, которые могут находиться в любом положении. Как правило, модификации, которые могут ингибировать гибридизацию, используются только в терминальных областях и предпочтительно не в сайте расщепления или в области расщепления последовательности, которая нацелена на последовательность или ген-индивидуум. Они могут использоваться в каком-либо участке смысловой последовательности при условии, что сохраняется достаточная степень гибридизации между двумя последовательностями iRNA-средства. В некоторых вариантах осуществления желательно поместить NRM в сайт расщепления или в область расщепления последовательности, которая не нацелена на последовательность или ген-индивидуум, поскольку это может минимизировать сайленсинг вне последовательности-мишени.

В большинстве случаев модификации, способствующие устойчивости к нуклеазам, будут распределены по-разному в зависимости от того, будет ли последовательность нацелена на последовательность у индивидуума (часто называют антисмысловой последовательностью) или не будет нацелена на последовательность у индивидуума (часто называют смысловой последовательностью). Если последовательность должна быть нацелена на последовательности у индивидуума, модификации, которые вносятся в расщепление или ингибируют расщепление эндонуклеазами, не должны быть встроены в область, которая является индивидуумом расщепления, опосредованного RISC, например в сайт расщепления или область расщепления (как описано в Elbashir *et al.*, 2001, Genes and Dev. 15:188, тем самым включенном посредством ссылки). Расщепление мишени происходит примерно в середине 20 или 21 nt «лидирующей» РНК или приблизительно на 10 или 11 нуклеотидов выше первого нуклеотида, который комплементарен лидирующей последовательности. Как используется в настоящем документе, сайт расщепления относится к нуклеотиду, находящемуся с любой стороны сайта расщепления, на мишени или на цепи iRNA-средства, которая гибридизована с ним. Область расщепления означает нуклеотид с 1, 2 или 3 нуклеотидами сайта расщепления в любом направлении.

Такие модификации могут быть встроены в терминальные области, например в терминальное положение или в концевые положения 2, 3, 4 или 5 последовательности,

которая нацелена, или последовательности, которая не нацелена на последовательность у индивидуума.

Связанные лиганды

Свойства iRNA-средства, включая его фармакологические свойства, могут быть изменены и приспособлены для определенного применения посредством, например, введения лигандов, например связанных лигандов.

С iRNA-средством могут быть связаны самые разнообразные объекты, например лиганды, например, связанные с носителем конъюгированной с лигандом мономерной субъединицы. Примеры описаны ниже в контексте конъюгированной с лигандом мономерной субъединицы, но предпочтительно только, чтобы объекты могли быть присоединены к iRNA-средству в других точках.

Предпочтительные остатки - лиганды, которые соединены, предпочтительно ковалентно, либо прямо, либо косвенно через промежуточную связь, с носителем. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд соединен с носителем *посредством* промежуточной связи. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на конъюгированном с лигандом мономере, когда конъюгированный с лигандом мономер включается в растущую цепь. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть включен в «предшественник» конъюгированной с лигандом субъединицы мономера после того как «предшественник» конъюгированной с лигандом субъединицы мономера инкорпорирован в растущую цепь. Например, мономер, имеющий, например, связь, заканчивающуюся аминогруппой, например $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, может встраиваться в растущую смысловую или антисмысловую цепь. На последующей стадии, то есть после инкорпорации мономерной единицы предшественника в цепь лиганд, имеющий электрофильную группу, например группу сложного пентафторфенилового эфира или альдегидную группу, может быть прикреплен к предшественнику конъюгированного с лигандом мономера путем соединения электрофильной группы лиганда с терминальной нуклеофильной группой связи предшественника конъюгированной с лигандом мономерной субъединицы.

В предпочтительных вариантах осуществления лиганд влияет на распределение, нацеливание или срок действия iRNA-средства, в которое он включен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность к выбранной мишени, например молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например клеточному компартменту или компартменту органа, ткани, органу или части организма, например, по сравнению с разновидностью, у которой такой лиганд отсутствует.

Предпочтительные лиганды могут улучшать транспорт, гибридизацию и характеристики специфичности и также могут повысить устойчивость к нуклеазам полученного в результате природного или модифицированного олигонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанную в настоящем документе и/или природные или модифицированные рибонуклеотиды.

Лиганды, в общем, могут содержать терапевтические модификаторы, например, для того, чтобы усилить поглощение; диагностические соединения или репортерные группы, например, для того, чтобы контролировать распределение; средства, вызывающие поперечное сшивание; остатки, придающие устойчивость к нуклеазам; и природные или необычные нуклеиновые основания. Общие примеры включают липофильные вещества, липиды, стероиды (например, уваол, гецигенин, диосгенин), терпены (например, тритерпены, например, сарсасапогенин, фриделин,

эпифриделаноловое производное литохолевой кислоты), витамины (например, фолиевую кислоту, витамин А, биотин, пиридоксаль), углеводы, белки; средства, связывающие белки; молекулы, мишенью которых служит интегрин; поликатионные вещества, пептиды, полиамины и пептиды-имитаторы.

Лиганды могут содержать встречающееся в природе вещество (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (ЛПНП) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); аминокислоту или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, являющуюся полилизинном (PLL), поли-L-аспарагиновой кислотой, поли-L-глутаминовой кислотой, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактид-ко-гликолид), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионные остатки, например катионный липид, катионный порфилин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут содержать группы нацеливания, например средства для нацеливания на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с клеткой заданного типа, такой как клетка печени или клетка тощей кишки. Нацеливающая группа может быть тиреотропином, меланотропином, лектином, гликопротеидом, белком сурфактанта А, углеводом мицина, поливалентной лактозой, поливалентной галактозой, N-ацетилгалактозаминном, N-ацетилглюкозаминном, поливалентной маннозой, поливалентной фукозой, гликозилированными полиаминокислотами, поливалентной галактозой, трансферрином, бисфосфонатом, полиглутаматом, полиаспартатом, липидом, холестерином, стероидом, желчной кислотой, фолатом, витамином B₁₂, биотином или пептидом RGD или миметиком пептида RGD.

Лиганды могут быть белками, например гликопротеинами, или пептидами, например, молекулами, имеющими специфическую аффинность к ко-лиганду, или антителами, например, антителом, которое связывается с клеткой заданного типа, такой как раковая клетка, эндотелиальная клетка или клетка кости. Лиганды также могут содержать гормональные рецепторы и гормоны. Они также могут включать непептидные разновидности, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганд может быть, например, липополисахаридом, активатором киназы p38 MAP или активатором NF-κB.

Лиганд может быть веществом, например лекарственным средством, которое может увеличивать поступление iRNA-средства в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, посредством разрушения микротрубочек, микрофиламентов, и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может быть, например, таксоном, винкристином, винбластином, цитохалазином, нокодазолом, джаплакинолидом, латрункулином А, фаллоидином, свинхолидом А,

инданоцином или миосервином.

В одном аспекте лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида предпочтительно связывает сывороточный белок А, например сывороточный альбумин человека (HSA). Лиганд, связывающий HSA, делает возможным распределение конъюгата в ткань-мишень, например ткань печени, включая паренхиматозные клетки печени. В качестве лигандов могут использоваться также другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, может использоваться непростин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида могут (а) повышать устойчивость конъюгата к разложению, (б) улучшать нацеливание или транспортировку в клетку-мишень или клеточную мембрану, и/или (с) может использоваться для регуляции связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липидов может использоваться, чтобы смодулировать, например, контролировать связывание конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липидов, который связывает с HSA более прочно, будет с более низкой вероятностью нацелен на почки и, следовательно, с более низкой вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липидов, который связывается с HSA менее прочно, может использоваться, чтобы нацелить конъюгат на почки.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд, основанный на липиде, связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в непочечные ткани. Однако предпочтительно, чтобы аффинность была не настолько сильной, чтобы связывание HSA с лигандом стало бы необратимым.

В другом аспекте лиганд представляет собой остаток, например витамин, который захватывается клеткой-мишенью, например пролиферирующей клеткой. Они особенно применимы для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или доброкачественного типа, например раковых клеток. Типовые витамины включают витамин А, Е и К. Другие типовые витамины включают витамины В, например фолиевую кислоту, В₁₂, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, захватываемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (ЛПНП).

В другом аспекте лиганд представляет собой средство, усиливающее проникновение в клетки, предпочтительно спиральное средство, усиливающее проникновение в клетки. Предпочтительно средство является амфипатическим. Типовое средство - пептид, такой как tat или antennopodia. Если средство - пептид, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметики, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральное средство предпочтительно является альфа-спиральным средством, у которого предпочтительно есть липофильная и липофобная фазы.

Модификации 5'-фосфата

В предпочтительных вариантах осуществления iRNA-средства 5'-фосфорилированы или содержат аналог фосфорной группы в 5'-первичном конце. Модификации 5'-фосфата антисмысловой цепи включают те модификации, которые совместимы с сайленсингом генов, опосредованном RISC. 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

(метилированный или неметилированный в положении 7) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозиновый кэп (Arpp) и любую модифицированную или немодифицированную структуру нуклеотидного кэпа (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-моностиофосфат (фосфоротиоат; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-моностиофосфат (фосфородитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфоротиолат ((HO)2(O)P-S-5'); любое дополнительное сочетание монофосфата, дифосфата и трифосфатов с замещенным кислородом/серой (например, 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т.д.), 5'-фосфорамидаты ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т.д., например RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-алкилтерфосфонаты (R=алкилэфир=метоксиметил (MeOCH2-), этоксиметил и т.д., например RP(OH)(O)-O-5').

Смысловая цепь может быть модифицирована, чтобы инактивировать смысловую цепь и предотвратить формирование активного RISC, тем самым потенциально снижая эффекты за пределами мишени. Это можно достичь с помощью модификации, которая предотвращает 5'-фосфорилирование смысловой цепи, например модификацией 5'-О-метил рибонуклеотидами (см. Nykanen *et al.*, (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell 107, 309-321). Также могут использоваться другие модификации, которые предотвращают фосфорилирование, например простая замена 5'-ОН на Н, а не О-Ме. Альтернативно к 5'-фосфату может быть добавлена объемистая группа, превращающая его в фосфодиэфирную связь.

Доставка iRNA-средств в ткани и клетки

Препарат

Из iRNA-средств, описанных в настоящем документе, могут быть приготовлены препараты для введения индивидууму, предпочтительно для местного введения в легкие и носовые ходы (дыхательные ткани) посредством ингаляции или интраназального введения, или парентерально, например посредством инъекции.

Для простоты описания препараты, композиции и способы, обсуждаемые в данном разделе, касаются, главным образом, немодифицированных iRNA-средств. Тем не менее, следует понимать, что эти препараты, композиции и способы могут осуществляться с другими iRNA-средствами, например, модифицированными iRNA-средствами, и такое осуществление входит в объем изобретения.

Составленная композиция iRNA может принимать множество состояний. В некоторых примерах композиция является по меньшей мере частично кристаллической, однородно кристаллической и/или безводной (например, содержит менее 80, 50, 30, 20 или 10% воды). В другом примере iRNA находится в водной фазе, например, в растворе, который включает воду, эта форма является предпочтительной формой для ингаляционного введения.

Водная фаза или кристаллические композиции могут входить в состав средства доставки, например липосомы (особенно для водной фазы) или частицы (например, микрочастицы, которая может оказаться подходящей для кристаллической композиции). Как правило, композицию iRNA получают способом, который согласуется с предполагаемым способом введения.

Препарат iRNA может быть приготовлен в комбинации с другим средством, например другим терапевтическим средством или средством, которое стабилизирует iRNA, например белком, который образует комплекс с iRNA, чтобы образовать iRNP. Другие средства включают хелатирующие средства, например ЭДТА (например, чтобы удалить двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+}), соли,

ингибиторы РНКазы (например, ингибитор РНКазы с широкой специфичностью, такой как RNAsin) и т. д.

В одном варианте осуществления препарат iRNA включает другое iRNA-средство, например второе iRNA-средство, которое может опосредовать RNAi в отношении второго гена. Другие препараты могут включать по меньшей мере три, пять, десять, двадцать, пятьдесят или сто и более различных видов iRNA. В некоторых вариантах осуществления средства направлены против одного и того же вируса, но против различных последовательностей-мишеней. В другом варианте осуществления каждое из iRNA-средств направлено против отличающегося вируса. Как показано в примере, можно ингибировать более одного вируса путем введения двух iRNA-средств одновременно или через небольшие интервалы времени, каждое средство направлено против одного из вирусов.

Способы лечения и пути введения

Композиция, которая содержит iRNA-средство по настоящему изобретению, например iRNA-средство, которое нацелено на RSV или PIV, можно ввести индивидууму множеством путей. Типовые пути включают ингаляцию, интратекальное, паренхиматозное, внутривенное, назальное, пероральное и глазное введение. Предпочтительным путем введения iRNA-средств по настоящему изобретению является прямое введение в легкие и носовые ходы или системное - посредством парентерального введения.

iRNA-средство может входить в состав фармацевтических композиций, подходящих для введения. Например, композиции могут содержать одно или более iRNA-средств и фармацевтически приемлемый носитель. Как используется в настоящем документе, подразумевается, что формулировка «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, среду для диспергирования, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие всасывание и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известны в данной области. За исключением случаев, когда любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением, их использование в композициях рассматривается. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть введены многими способами в зависимости от того, желательно местное или системное лечение, а также в зависимости от области, которая будет подвергаться лечению. Введение может быть местным (включая глазное, интраназальное, чрескожное, интрапульмонарное), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное введение, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию, или интратекальное или внутрижелудочковое введение.

В целом, введение iRNA-средств по настоящему изобретению производится с тем, чтобы добиться доставки к месту локализации инфекции у индивидуума. Предпочтительным способом достижения этого служит либо местное введение в легкие или носовые ходы, например в респираторные ткани посредством ингаляции или интраназального введения, либо системное введение, например парентеральное введение.

Препараты для ингаляции или парентерального введения известны в данной области техники. Такой препарат может содержать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки.

Для внутривенного введения необходимо контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы сделать препарат изотоничным.

Активные соединения, раскрытые в настоящем документе, предпочтительно вводятся в легкое (легкие) или в носовые ходы индивидуума любыми подходящими средствами. Активные соединения могут быть введены путем применения аэрозольной суспензии частиц, подходящих для вдыхания и состоящих из активного соединения или активных соединений, которые индивидуум вдыхает. Активное соединение может быть аэрозольным во множестве форм, таких как, но ими не ограничиваясь, средства для ингаляции в виде сухого порошка, отмеренные дозы средства для ингаляции или суспензии жидкость/жидкость. Частицы, подходящие для вдыхания, могут быть жидкостью или твердым веществом. Необязательно частицы могут содержать другие терапевтические ингредиенты, такие как амилорид, бензамил или фенамил, где выбранное соединение содержится в количестве, способном эффективно ингибировать реабсорбцию воды из слизистых секретов дыхательных путей, как описано в патенте США No. 4501729.

Фармацевтическая композиция, состоящая из частиц, необязательно может быть объединена с носителем, чтобы облегчить диспергирование или транспорт. Подходящий носитель, такой как сахар (то есть лактоза, сахароза, трегалоза, маннит) может быть смешан с активным соединением или соединениями в любом подходящем отношении (например, в отношении 1:1 по массе).

Частицы, состоящие из активного соединения для осуществления настоящего изобретения, должны содержать частицы подходящего для вдыхания размера, то есть частицы достаточно малого размера, чтобы при ингаляции проникнуть через рот или нос и гортань в бронхи и альвеолы легких. В целом, для вдыхания подходят частицы, чей размер составляет приблизительно 1-10 микрон (конкретнее менее приблизительно 5 микрон). Частицы размера, не подходящего для вдыхания, которые содержатся в аэрозоле, склонны оседать в глотке и проглатываться, и количество в аэрозоле частиц, не подходящих для вдыхания, предпочтительно минимизировано. Для назального введения предпочтителен размер частиц 10-500 мкм, чтобы обеспечить задержку в полости носа.

Жидкие фармацевтические композиции активного соединения для получения аэрозоля могут быть получены путем объединения активного соединения с подходящим растворителем, таким как стерильная, не содержащая пирогенов вода. Гипертонические солевые растворы, используемые для осуществления настоящего изобретения, предпочтительно являются стерильными, не содержащими пирогенов растворами, содержащими от одного до пятнадцати процентов (по массе) физиологически приемлемой соли, и более предпочтительно от трех до семи процентов по массе физиологически приемлемой соли.

Аэрозоли жидких частиц, содержащих активное соединение, могут быть получены любыми подходящими способами, например с помощью струйного распылителя, приводимого в движение давлением, или ультразвукового распылителя. См., например, патент США № 4501729. Распылители - это имеющиеся в продаже устройства, которые превращают растворы или суспензии активного ингредиента в терапевтический аэрозольный туман, либо посредством ускорения сжатого газа, в типичном случае - воздуха или кислорода, проходящего через узкое отверстие Вентури, или посредством ультразвукового встряхивания.

Подходящие препараты для применения в распылителях состоят из активного ингредиента в жидком носителе, где активный ингредиент составляет 40% мас./мас.

препарата, но предпочтительно менее 20% мас./мас. Носителем типично является вода (и наиболее предпочтительно стерильная, свободная от пирогенов вода) или разбавленный водный спиртовой раствор, предпочтительно сделанный изотоническим, но он может сделан и гипертоническим по отношению к жидкостям организма путем добавлением, например, хлорида натрия. Необязательные добавки включают консерванты, если препарат не сделан стерильным, например метилгидроксibenзоат, антиоксиданты, ароматические средства, эфирные масла, буферы и поверхностно-активные вещества.

Аналогично, аэрозоли твердых частиц, содержащих активное соединение, могут быть получены с помощью любого генератора терапевтических аэрозолей, состоящих из частиц. Генераторы аэрозолей для введения терапевтических средств, состоящих из твердых частиц, индивидууму производят частицы, которые подходят для вдыхания, и создают объем аэрозоля, содержащий определенную отмеренную дозу терапевтического средства, со скоростью, подходящей для введения человеку. Одним иллюстративным типом генератора аэрозолей, состоящих из твердых частиц, служит инсуффлятор. Подходящие препараты для введения вдвуханием включают тонкомолотые порошки, которые возможно ввести посредством инсуффлятора или поместить в полость носа путем втягивания носом. В инсуффляторе порошок (например, отмеренная доза порошка, эффективная для того, чтобы выполнить лечение, описанное в настоящем документе) содержится в капсулах или картриджах, типично сделанных из желатина или пластмассы, которые либо прокалываются либо открываются *in situ*, и порошок доставляется воздухом, протягиваемым через устройство при ингаляции, или посредством ручного насоса. Порошок, используемый в инсуффляторе, состоит или исключительно из активного ингредиента или из порошковой смеси, содержащей активный ингредиент, подходящий порошковый разбавитель, такой как лактоза, и необязательно поверхностно-активного вещества. Активный ингредиент типично составляет от 0,1 до 100 мас./мас. композиции.

Второй тип иллюстративного генератора аэрозолей включает ингалятор-дозатор. Ингаляторы-дозаторы представляют собой находящиеся под давлением распылители аэрозоля, которые типично содержат суспензию или раствор активного ингредиента в сжиженном газ-вытеснителе. Во время использования эти устройства выбрасывают препарат через клапан, приспособленный для выпуска отмеренного объема, типично от 10 до 200 мкл, чтобы получить аэрозоль из мелких частиц, содержащий активный ингредиент. Подходящие газы-вытеснители включают определенные соединения хлорфторуглерода, например дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан и их смеси. Препарат может дополнительно содержать один и более дополнительных растворителей, например этанол, поверхностно-активные вещества, такие как олеиновая кислота или сорбитантриолеат, антиоксидант и подходящие ароматизаторы.

Введение может производиться индивидуумом или другим человеком, например лицом, осуществляющим уход. Лицо, осуществляющее уход, может быть любым объектом, связанным с обеспечением ухода за человеком: например, больницей, хосписом, кабинетом врача, амбулаторной клиникой; медработником, таким как врач, медсестра или другой практикующий специалист; или супругом или опекуном, таким как родитель. Лекарственное средство можно предоставлять в отмеренных дозах или в распылителе, который вводит измеренную дозу.

Термин «терапевтически эффективное количество» обозначает количество, присутствующее в композиции, которое необходимо, чтобы обеспечить желаемый

уровень лекарственного средства у индивидуума, который подвергается лечению, чтобы дать ожидаемую физиологическую реакцию. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество двух и более iRNA-средств, каждое из которых направленно против отличающегося респираторного вируса, например RSV и PIV, вводится индивидууму одновременно.

Термин «физиологически эффективное количество» означает количество, введенное индивидууму, чтобы получить желаемый паллиативный или лечебный эффект.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает, что носитель может поступать в легкие без существенного неблагоприятного токсикологического воздействия на легкие.

Типы фармацевтических наполнителей, которые применимы в качестве носителя, включают стабилизаторы, такие как сывороточный альбумин человека (HSA), средства, увеличивающие объем, такие как углеводы, аминокислоты и полипептиды; регуляторы pH или буферы; соли, такие как хлорид натрия и т.п. Эти носители могут находиться в кристаллической или аморфной форме, или могут быть смесью обеих.

Особо ценные средства, увеличивающие объем, включают совместимые углеводы, полипептиды, аминокислоты или их комбинации. Подходящие углеводы включают моносахариды, такие как галактоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, трегалоза и т.п.; циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрин; и полисахариды, такие как раффиноза, мальтодекстрины, декстраны и т.п.; альдиты, такие как маннит, ксилит и т.п. Предпочтительная группа углеводов включает лактозу, трегалозу, раффинозу, мальтодекстрины и маннит. Подходящие полипептиды включают аспартам. Аминокислоты включают аланин и глицин, предпочтителен глицин.

Подходящие регуляторы pH или буферы включают органические соли, полученные из органических кислот и оснований, такие как цитрат натрия, аскорбат натрия и т.п.; предпочтителен цитрат натрия.

Дозировка. iRNA-средство может быть введено в разовой дозе менее приблизительно 75 мг на кг массы тела или менее приблизительно 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 или 0,0005 мг на кг массы тела и менее 200 нмоль РНК-средства (например, приблизительно $4,4 \times 10^{16}$ копий) на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 нмоль РНК-средства на кг массы тела. Разовая доза, например, может быть введена с помощью инъекции (например, внутривенной или внутримышечной, интратекально или непосредственно в орган), вдыхания дозы или местного нанесения.

Введение iRNA-средства непосредственно в орган (например, непосредственно в печень) может осуществляться в дозировке от приблизительно 0,00001 мг до приблизительно 3 мг на орган или предпочтительно приблизительно 0,0001-0,001 мг на орган, приблизительно 0,03-3,0 мг на орган, приблизительно 0,1-3,0 мг на глаз или приблизительно 0,3-3,0 мг на орган.

Дозировка может быть количеством, эффективным для лечения или предотвращения заболевания или расстройства.

В одном варианте осуществления стандартная доза вводится реже, чем один раз в сутки, например реже, чем каждые 2, 4, 8 или 30 дней. В другом варианте осуществления стандартная доза не вводится с некой частотой (например, не с регулярной частотой). Например, стандартная доза может быть введена однократно.

В одном варианте осуществления эффективная доза вводится наряду с другими традиционными лечебными воздействиями.

В одном варианте осуществления индивидууму вводится начальная доза и одна и более поддерживающих доз iRNA-средства, например двухспирального iRNA-средства или siRNA средства (например, предшественника, например, более крупное iRNA-средство, которое может превращаться в siRNA средство, или ДНК, которая кодирует iRNA-средство, например двухспиральное iRNA-средство или siRNA средство или его предшественник). Поддерживающая доза или дозы, как правило, ниже начальной дозы, например, вдвое меньше начальной дозы. Поддерживающий режим может предусматривать лечение индивидуума дозой или дозами от 0,01 мкг к 75 мг/кг массы тела в сутки, например 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 или 0,0005 мг на кг массы тела в сутки. Поддерживающие дозы предпочтительно вводятся не чаще, чем каждые 5, 10 или 30 дней. Кроме того, режим лечения может длиться в течение времени, которое будет меняться в зависимости от природы конкретного заболевания, его серьезности и общего состояния пациента. В предпочтительных вариантах осуществления доза вводится не чаще раза сутки, например не чаще раза за 24, 36, 48 и более часов, например не чаще, чем раз в 5 или 8 дней. После лечения пациента могут обследовать на предмет изменений в его состоянии и облегчения симптомов болезненного состояния. Дозировка соединения может быть увеличена в случае, когда пациент не дает существенной реакции на текущую дозировку, или доза может быть снижена, если наблюдается облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние исчезло или если наблюдаются нежелательные побочные эффекты.

Эффективная доза может вводиться в виде одной дозы или двух и более доз, что желательно или считается подходящим при определенных обстоятельствах. Если желательно облегчить повторные или частые инфузии, может оказаться целесообразным имплантация устройства для введения, например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, интраперитонеального, интрацистеального или интракапсулярного) или резервуара.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция iRNA-средства содержит ряд разновидностей iRNA-средств. Разновидности iRNA-средства могут иметь последовательности неперекрывающиеся и несмежные по отношению к природной последовательности-мишени, например последовательности-мишени гена RSV. В другом варианте осуществления ряд разновидностей iRNA-средства специфичен для различных природных генов-мишеней. Например, iRNA-средство, которое нацелено на ген белка P RSV, может присутствовать в той же фармацевтической композиции, что и iRNA-средство, нацеленное на другой ген, например ген белка N. В другом варианте осуществления iRNA-средства являются специфичными для различных вирусов, например RSV и PIV.

После успешного лечения может оказаться желательным подвергнуть пациента поддерживающей терапии, чтобы предотвратить рецидив состояния заболевания, где соединение по изобретению вводится в поддерживающих дозах, колеблющихся от 0,01 мкг до 100 г на кг массы тела (см. US 6107094).

Концентрация композиции iRNA-средства представляет собой количество, достаточное, чтобы эффективно лечить или предотвращать расстройства или регулировать физиологическое состояние у людей. Концентрация или количество введенного iRNA-средства будут зависеть от параметров, установленных для средства и способа введения, например назального, буккального или легочного. Например, у назальных препаратов концентрации некоторых ингредиентов обычно намного более низкие, чтобы избежать раздражения или жжения носовых ходов. Иногда препарат

для перорального применения желательно разбавить в 10-100 раз, чтобы получить подходящий назальный препарат.

Определенные факторы могут влиять на дозировку, требуемую для эффективного лечения индивидуума, включая, но не ограничиваясь серьезностью заболевания или расстройства, предыдущим лечением, общим состоянием и/или возрастом индивидуума и другими имеющимися заболеваниями. Кроме того, лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством iRNA-средства, например двухспирального iRNA-средства или siRNA средства (например, предшественником, например, более крупным iRNA-средством, которое может быть превращено в siRNA средство, или ДНК, которая кодирует iRNA-средство, например двухспиральное iRNA-средство или siRNA средство или его предшественник), может включать один курс лечения или, предпочтительно, может включать ряд курсов лечения. Кроме того, будет учитываться, что эффективная дозировка iRNA-средства, такого как siRNA средство, используемое для лечения, во время конкретного курса лечения может повышаться или снижаться. Изменения дозировки могут привести к и стать явными по результатам диагностических исследований, как описано в настоящем документе. Например, после применения композиции iRNA-средства за индивидуумом могут наблюдать. На основании информации, полученной при наблюдении, может вводиться дополнительное количество композиции iRNA-средства.

Дозирование зависит от серьезности и выраженности отклика болезненного состояния, которое подвергается лечению, курс лечения будет длиться от нескольких дней до нескольких месяцев или до тех пор, пока происходит излечение или достигается ослабление болезненного состояния. Оптимальные схемы дозирования могут быть рассчитаны по измерениям накопления лекарственного средства в организме пациента. Средние специалисты легко могут определить оптимальные дозировки, методологию дозирования и частоту повторения. Оптимальные дозировки могут меняться в зависимости от относительной активности индивидуальных соединений и могут, как правило, оцениваться на основании EC50, которые, как обнаружилось, эффективны *in vitro* и на животной модели *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления животная модель включает трансгенных животных, которые экспрессируют ген человека, например ген, который производит РНК-мишень RSV. У трансгенного животного может быть недостаток соответствующей эндогенной РНК. В другом варианте осуществления композиция для тестирования содержит iRNA-средство, которое комплементарно, по меньшей мере во внутренней области, последовательности, которая консервативна для РНК-мишени RSV у животной модели и РНК-мишени RSV у человека.

Изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться как дополнительное ограничение.

ПРИМЕРЫ

Конструирование противовирусных siRNA против мРНК RSV и фосфопротеина NP13

siRNA против RSV P и siRNA против мРНК NP13 P синтезированы химически (Bitko, V. & Bank, S. *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001)) и определен их IC50 (концентрация siRNA, вызывающая 50% снижение мишени) *ex vivo* (фиг. 1a). Последовательности siRNA и значения IC50 перечислены (таблица 1). Две siRNA против RSV-P (#1, #2) и одна против NP13 (#4) показали значительную ингибирующую активность и были выбраны для дальнейшего изучения. Корреляция мРНК-мишени с белком, как иллюстрируется для siRNA#1 (фиг. 1a), согласуется с

механизмом RNAi, и как авторы показали ниже, подавляющая активность siRNA *ex vivo* также согласуется с его активностью у животного (*in vivo*). Таким образом, *ex vivo* анализ обеспечивает надежный, недорогой, быстрый и удобный метод начальной проверки противовирусного siRNA-средства.

При интраназальном введении (IN) siRNA ингибируют репликацию RSV и HPIV3 в легком мыши

Чтобы определить, будут ли siRNA, активные *ex vivo*, эффективны при настоящей инфекции, использовали животную модель. Мышь BALB/c - традиционная лабораторная модель для инфекции RSV для изучения прогрессирования, патологии и иммунологии заболевания (Graham, B.S., et al., *J. Med. Virol.* 26,153-162 (1988), van Schaik, S.M., et al., *J. Infect. Dis.* 177,269-276 (1998), Haerberle, H.A. et al. *J. Virol.* 75, 878-890 (2001)). Мышам интраназально вводили siRNA в комплексе с реагентом TransIT-ТКО®, и через 4 часа каждое животное инфицировали 10^7 БОЕ RSV или HPIV3, также интраназально. Максимальное размножение RSV в легком мыши наблюдался приблизительно через 5-6 дней p.i. и это момент времени использовали в дальнейших исследованиях. siRNA, которые были эффективны *ex vivo* (фиг.1a), проявили мощное противовирусное действие у животных (фиг.1b, c). В дозе 5 нмоль IN siRNA (в среднем ~70 мкг двухспиральный siRNA) на мышь, siRNA#1 и siRNA#4, соответственно, снижали титр RSV и титр HPIV3 в легком примерно в 5000 и 100 раз при раздельной инфекции (фиг.1b, c). Важно, что siRNA, свободная от реактивов трансфекции, тоже существенно ингибировал титры вируса в легком (фиг.1d). Это доказывает, что противовирусное лечение, основанное на ингаляциях, возможно с использованием простых фармацевтических композиций, содержащих iRNA-средство. Следует отметить, что HPIV3 не инфицирует мышей так легко, как RSV (Durbin, A.R, Elkins, W.R. & Murphy, B.R. *Vaccine* 18,2462-2469 (2000)), что служит причиной относительно более низкой репликации HPIV3 в легком мыши (фиг.1c). Применение очищенного от сахарозы высокого титра HPIV3 в качестве инокулята позволило получить на модели измеримую инфекцию легкого мыши.

Несколько дополнительных особенностей примера применимы к различным вариантам осуществления настоящего изобретения. Во-первых, результаты демонстрируют вирус-специфичное влияние siRNA (фиг.1). Даже самая мощная анти-RSV siRNA (#1) ингибирует только RSV, но не HPIV3, и наоборот, что само по себе служит доводом против неспецифического противовирусного влияния IN siRNA. Во-вторых, siRNA против люциферазы (Elbashir, S.M. et al. *Nature* 411, 494-498 (2001)) даже в самой высокой из испытанных доз (50 нмоль или 700 мкг/мышь) не ингибировал ни один вирус (фиг.1b-d). Наконец, IN siRNA в отдельности или вместе с реагентом Transit-ТКО у неинфицированных мышей не вызывала явного дискомфорта (что определялось по нормальной шерсти, активности, аппетиту и привесу, и отсутствию респираторных нарушений), что свидетельствует о благоприятной фармакологии для потенциальной разработки лекарственного средства.

Следует отметить, что во всех экспериментах, описанных в настоящем документе, результаты вирусного белкового иммуноблоттинга всегда совпадали с титром вируса, и следовательно, для данного эксперимента каждый может служить резервным маркером другого, и все комплементарные данные не приведены.

Специфические противовирусные эффекты IN siRNA предотвращают легочную инфекцию

Хотя представленные выше результаты подтверждают ингибирование вирусной

репликации, они не являются прямым доказательством прекращения инфекции в легочной ткани. Поэтому авторы исследовали различные срезы обоих легких через 5 дней p.i. применения антител, специфичных для соответствующего вируса. При инстиляции 10^7 БОЕ мыши оба вируса вызывали тяжелую легочную инфекцию. В характерных результатах (фиг.2а) инфекция была значительно ослаблена у мышей, которым предварительно ввели 5 нмоль (70 мкг) анти-RSV siRNA#1 в комплексе с TransIT-ТКО. Подобное ослабление инфекции, вызванной HPIV3, также было отмечено после 5 нмоль анти-HPIV3 siRNA#4. Как и в случае титра вируса, siRNA без реактива трансфекции показала существенное ослабление инфекции, что представлено для RSV. Для такого же количества siRNA авторы подсчитали, что siRNA без реактивов была бы примерно на 70-80% столь же эффективна, как siRNA в комплексе с TransIT-ТКО. Хотя авторы только представили данные для TransIT-ТКО в комплексе с siRNA в остальной части документа, эти результаты указывают на захватывающую перспективу: интраназальное введение “голой” siRNA, свободной от других химических веществ, может создать существенную защиту против возбудителей респираторных инфекций. Это особенно важно, поскольку у самих реактивов для трансфекции могут быть побочные эффекты. Авторы отметили здесь, что полиэтиленмин (PEI) успешно использовался в качестве носителя для внутривенного (IV), а также эндотрахеального (IT) введения siRNA и ДНК против вируса гриппа (Ge, Q., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8676-8681 (2004)). Однако, согласно опыту авторов, прямое IN введение PEI, в отдельности или вместе siRNA, часто приводило к явной болезни и/или к смерти мыши.

IN введенная siRNA локализуется в легких и не активирует интерферон

Чтобы получить новые доказательства того, что ингибирование вируса, наблюдаемое в легком, было прямым и специфическим эффектом введенной через нос siRNA, выполнили два вида экспериментов. Во-первых, авторы смогли обнаружить антисмысловую цепь siRNA в ткани легкого (фиг. 2b) с помощью специфического Нозерн-блоттинга. Во-вторых, возможность того, что противовирусный эффект siRNA обусловлен активацией интерферонов (IFN), была исключена следующим образом. Парамиксовирусы, в целом, кодируют различные механизмы для противодействия IFN; RSV, в частности, в значительной степени устойчив к IFN типа I (IFN- α/β), хотя чувствителен к IFN типа II (IFN- γ) (Schlender, J., et al., *J. Virol.* 74, 8234-8242 (2000), Ramaswamy, M., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 893-900 (2004)). Предшествующие исследования авторов показала, что siRNA активны против RSV и HPIV3 в клетках Vero, которые содержат делеции генов IFN типа I (данные не приведены). Тем не менее, авторы измерили уровни IFN- α и IFN- γ в тканях легкого мыши в различные дни после лечения различным siRNA и не обнаружили активации любого типа IFN (фиг.2с).

siRNA избирательно защищают против RSV и HPIV3 при смешанной инфекции

Всегда имеется возможность коинфекции дыхательных путей, вызванной несколькими возбудителями, и в некоторых исследованиях была диагностирована смешанная инфекция, вызванная RSV и HPIV3 (Coiras, M.T., et al, *J. Med. Virol.* 72, 484-495 (2004)). Фактически, химерные вирусы и рекомбинантные вакцины, включающие RSV, а также антигены HPIV3, были сконструированы в надежде, что они создадут одновременную защиту против обоих вирусов (Schmidt, A.C., et al., *J. Virol.* 75, 4594-4603 (2001), Bernhard, W. et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 725-731 (2001)). Специфический противовирусный эффект siRNA#1 и siRNA#4 против RSV и HPIV3, соответственно, побудил авторов проверить их вместе (5 нмоль или 70 мкг

каждого) при смешанной инфекции мышей, вызванной обоими вирусами.

Контрольных мышей лечили одним видом siRNA (или #1 или #4). Поскольку нет легкого способа определить количество БОЕ каждого вируса в смеси двух вирусов, авторы обратились к иммунофлюоресцентной микроскопии, как описано выше, и

5 подвергли срезы ткани легкого двойному окрашиванию, используя смесь антител к RSV и HPIV3. Смешанная инфекция ткани легкого согласно данному критерию в самом деле возникла (фиг.2d). У мышей, предварительно получивших или siRNA#1, или siRNA#4, инфекция, вызванная RSV и HPIV3, соответственно, была

10 предотвращена, что наблюдалось по исчезновению или зеленой, или красной флюоресценции, но не обоих (фиг.2d). При использовании комбинации двух siRNA (5 нмоль, то есть 70 мкг каждого) оба типа флюоресценции исчезли, что подтвердило ингибирование обоих вирусов (фиг.2d). Как и прежде, та же самая смесь siRNA без любого реактива для трансфекции также была высокоактивной (данные не

15 приведены). Интересно, что если использовали чрезмерно высокое количество одной siRNA, действие другой siRNA в анализе двойной инфекции было ингибировано (фиг.3).

Количественным RT-PCR в реальном времени, IC50 siRNA#4 (против HPIV3 P) *ex vivo*

20 увеличилось до 15,35 и 100 нМ, поскольку концентрацию siRNA#1 (против RSV P) подняли с 0 до 20-200 нМ (фиг.3а). Эти результаты были утверждены

измерением HPIV3 Белка Р в иммуноблоте (фиг.3б). При двойной инфекции мышей количественное определение с помощью иммуноблоттинга белка каждого вируса дало по существу идентичное заключение: хотя 5 нмоль (70 мкг) каждой siRNA эффективно

25 ингибировали оба вируса, 50 нмоль одной siRNA ослабляли эффект 5 нмоль взаимно другой (фиг.3с).

IN введенная siRNA предотвращают легочную патологию

Поскольку siRNA предотвращают инфекцию, возникает логичный вопрос,

30 предотвращают ли они также развитие патологических признаков. При визуальном осмотре мыши, леченные siRNA и подвергшиеся заражению RSV, вели себя и выглядели по существу также как неинфицированные мыши с нормальной

активностью, блестящей шерстью и хорошим общим состоянием. Затем авторы измерили частоту дыхания, индукцию лейкотриенов и легочное воспаление. Известно, что частота дыхания мышей BALB/c возрастает в ответ на инфекцию, вызванную RSV (Haeberle, H.A. *et al J. Virol.* 75, 878-890 (2001), Volovitz, B., et al., *Pediatr. Res.* 24, 504-507 (1988)). Лейкотриены, продукт липооксигеназного пути, связываются с

лейкотриеновыми рецепторами, присутствующими в гладких мышцах бронхов, и

40 содержание лейкотриенов нарастает в секрете дыхательных путей больных астмой, грудных детей с RSV-инфекцией и мышей, зараженных RSV (Volovitz, B., et al., *Pediatr. Res.* 24, 504-507 (1988), Welliver, R.C., 2nd, et al., *J. Infect. Dis.* 187, 1773-1779 (2003)). Эти

соединения стимулируют секрецию слизи в дыхательных путях, бронхоспазм и

инфильтрацию дыхательных путей клетками воспаления, которые являются важными

45 признаками тяжелого заболевания, вызванного RSV. Если авторы вводили siRNA#1 против RSV одновременно с (или перед) RSV, наблюдалось существенное снижение частоты дыхания, ослабление легочной гистопатологии и накопления лейкотриена в бронхоальвеолярной жидкости (BALF) (фиг.4). Эти показатели остались вблизи

50 исходных и были по существу сопоставимы с показателями у мышей, подвергшихся имитации заражения. Все параметры оставались низкими по меньшей мере 14 дней после заражения, это доказывает, что siRNA действительно предотвращает болезнь, а не делает ее начало более поздним. Фактически, мыши, леченные siRNA, не проявляли

видимых дыхательных нарушений в течение 6 недель наблюдения. Отрицательный контроль РНК или luc-siRNA (таблица 1) не давали облегчения во всех экспериментах (данные не приведены).

IN введенная siRNA оказывает эффективное противовирусное действие после заражения

Показав, что siRNA, введенные до заражения, могут предотвратить респираторное вирусное заболевание, авторы задались вопросом, могут ли они оказывать лечебный эффект после того, как развилась инфекция, поскольку это является важной целью в педиатрической медицине. В данном ряду экспериментов авторы вводили siRNA#1 в различные дни после заражения RSV и ежедневно взвешивали мышей. Как известно, масса тела мышей снижается в течение приблизительно 8-10 дней после заражения RSV, после чего они или умирают, или медленно восстанавливают массу тела в зависимости от размера начального инокулята - слишком высокого или умеренно-низкого (Haeberle, H.A. *et al. J. Virol.* 75, 878-890 (2001)). В подобной когортке мышей в определенные дни изымали легкие для анализа на инфекционный вирус. Как и предполагалось, у не леченных siRNA мышей масса тела сохранялась приблизительно 4 дня p.i., а затем постепенно снижалась, снижение длилось по меньшей мере 9 дней (фиг.5a). Мыши, получившие siRNA до (данные не приведены) или вместе с RSV (день 0), по существу выглядели неинфицированным и продолжали непрерывно набирать массу тела. Большинство мышей, получивших siRNA в день 1, также было трудно отличить от контрольных животных, которым была проведена имитация заражения. У мышей, получивших siRNA в последующие дни (день 1-4), защита была все более и более слабой, хотя существенное нарастание массы наблюдалось во все дни при всех вариантах лечения.

Определение легочного титра RSV у этих мышей дни 2, 4, 6, 8, 10 и 16 дало схожую картину (фиг.5b). У не леченных siRNA мышей титр повышался до дня 4-5 и затем медленно спадал до неопределимого уровня к дню 16. Введение siRNA до или одновременно с заражением RSV удерживало титр в 5000 раз более низким во все дни, в которых производилось исследование. Эффективность введения siRNA в более поздние сроки инфекции прогрессивно уменьшалась, но титр вируса был всегда ниже, чем у нелеченых контрольных животных в любой проверенный день. Представлялось, что siRNA, независимо от срока введения, замедляла скорость вирусной репликации, что приводило к более низкому пиковому титру. Впоследствии титр падал ниже определяемого уровня тем быстрее, чем раньше была введена siRNA. Например, хотя в зараженных мышках легочный RSV определялся приблизительно до 16-го дня p.i., у мышей, получивших siRNA в день 1, вирус не определялся после 10-го дня p.i. Как и прежде, отрицательная контрольная siRNA или siRNA люциферазы (таблица 1) не оказывали влияния во всех экспериментах (данные не приведены). Вместе эти результаты показали, что siRNA против Р RSV оказывала лечебный эффект даже при введении после заражения, и что мыши были всегда менее больными и быстрее выздоравливали, чем когорты мышей, не подвергавшиеся лечению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной вывод данного документа заключается в том, что соответственно сконструированные siRNA, введенные интраназально, защищают от респираторной инфекции, а также обеспечивают эффективное лечение, если применяются после заражения. siRNA, введенные в аэрозоле, состоящем из мелких частиц, из простого карманного ингалятора, могут использоваться для профилактики или лечения легочных инфекций. Пока рукопись авторов находилась в стадии подготовки,

появились два сообщения, в которых siRNA ингибировали вирус гриппа, еще один из основных возбудителей респираторных инфекций, у мышей (Ge, Q., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8676-8681 (2004), Tompkins, S.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8682-8686 (2004)). В одном исследовании (Ge, Q., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8676-8681 (2004)) синтетическую siRNA или плазмидную ДНК, экспрессирующую siRNA, вводили с помощью комбинации IV и IT путей. В другом исследовании (Tompkins, S.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8682-8686 (2004)) siRNA сначала вводили гидродинамическим внутривенным введением, через 16-24 часа мышей инфицировали вирусом гриппа и вводили вторую дозу siRNA в липидном носителе, оба интраназально. Присутствие вируса в легких определяли через 2 дня и наблюдалось ингибирование различных штаммов вируса гриппа в 10-50 раз. Исследования авторов, касающиеся RSV и PIV, предложили следующее улучшение и упрощение ранее упомянутых: (i) Введение только интраназальное, следовательно, относительно неинвазивное и безболезненное, может осуществляться с помощью ингалятора или лечебного тумана, (ii) siRNA без любого носителя обладает высокой эффективностью, что снижает потенциальный риск побочных эффектов, вызываемых носителем, (iii) Разовая доза приблизительно 5 нмоль siRNA (70 мкг двухцепочечной РНК), по-видимому, обеспечивает благоприятное действие в течение всей продолжительности инфекции. Более тщательная проверка последовательности-мишени (то есть RSV Р) и использование новой химии может дать siRNA с намного более низким IC₅₀ и лучшей фармакокинетикой, что приводит к снижению дозировки. siRNA в разной степени проявляют неспецифические эффекты, обусловленные связыванием не с мишенью, особенно в высоких концентрациях (Jackson, A.L. et al. *Nat. Biotechnol.* 21, 635-637 (2003), Sledz, C.A., et al., *Nat. Cell Biol.* 5, 834-839 (2003), Persengiev, S.P., et al., *RNA* 10, 12-18 (2004), Bridge, A.J., et al., *Nat. Genet.* 34, 263-264 (2003)). Это очевидный источник опасений в лечении, и внутривенное введение siRNA может привести к системным побочным эффектам. При интраназальном введении siRNA, напротив, вероятнее всего, будет сконцентрирована или исключительно локализована в респираторных тканях, тем самым ослабляя побочные эффекты. Отсутствие активации IFN интраназально введенной синтетической siRNA поддерживает и расширяет предыдущие данные о том, что химические синтезированные siRNA, лишенные 5' фосфатов, не активируют IFN путь в культуре клеток (Kim, D.H. et al. *Nat. Biotechnol.* 22, 321-325 (2004)). Корреляция противовирусной активности со специфическим подавлением мРНК (фиг.1), обнаружение siRNA в ткани-мишени (легких) (фиг.2b), отсутствие активации IFN (фиг.2с) и вирус-специфический эффект siRNA (фиг. 1-3) - все вместе они доказывают, что противовирусный эффект специфичный, направленный и опосредован RNAi. (iii) Респираторные вирусы, такие как RSV и PIV, проявляют высокую избирательность в тропизме к тканям, инфицируя респираторные ткани. Таким образом, интраназальное введение гарантирует, что siRNA будет направлена в место локализации инфекции - идеальное условие для фармакологии.

Хотя RSV и HPIV иногда вызывают смешанную инфекцию, их взаимодействие по большей части игнорируется. Точная причина наблюдаемого ингибирования одной siRNA другой нуждается в дальнейшем исследовании. Тот факт, что это происходит *ex vivo* (в культуре клеток) служит возражением против, но не исключает, у животных роли гуморальных факторов и цитокинов, таких как интерферон. RSV на самом деле ингибирует активацию интерферона (Schlender, J., et al., *J. Virol* 74, 8234-8242 (2000), Ramaswamy, M., et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30, 893-900 (2004)), и

следовательно, должен облегчать, а не ингибировать размножение PIV. Другая возможность заключается в том, что размножение одного вируса ингибирует размножение другого посредством иных механизмов, таких как конкуренция за внутриклеточные запасы. С другой стороны, известно, что аппарат RNAi в клетке способен к насыщению, поэтому две siRNA потенциально могут конкурировать за ограниченный резерв данного аппарата (Barik, S. *Virus Res.* 102, 27-35 (2004), (Hutvagner, G, et al., *PLoS Biol.* 2, E98 (2004)). Следует заметить, что такую конкуренцию можно оценить только при относительно высоких дозах siRNA, составляющих десятки или сотни наномоль (фиг. 3). Напротив, лишь несколько наномоль siRNA, полученных авторами, обеспечивают почти полную защиту мышей. Таким образом, наблюдаемая конкуренция не имеет практической значимости при siRNA с IC50 в наномолярном диапазоне.

Когда siRNA используется в качестве профилактического средства, она не только предотвращает инфекции, но и ингибирует появление различных аспектов болезненного процесса, что измеряется по массе тела, легочной патологии, параметрам дыхания и маркерам аллергии (фиг.4). Кинетика болезненного процесса у мышей и людей относительно схожа, и у обоих видов иммунопатологические изменения возникают вскоре после заражения RSV. Если siRNA используются как лекарственное средство после того, как инфекция развилась, ожидается, что они не корректируют уже возникшую патологию. Тем не менее, даже в этом случае ингибирование дальнейшего размножения вируса ускоряет излечение и выздоровление (фиг.5). Таким образом, представляется, что «окно благоприятной возможности» лечения существует во все время у пациентов с RSV-инфекцией, хотя при любом заболевании ранее лечение приводит к лучшему прогнозу. Эффективность “голой” siRNA нуждается в объяснении. Возможно, что респираторные ткани, особенно в легких по природе восприимчивы к обмену малых молекул или становятся такими после заражения.

Наконец, в зависимости от строгости связывания siRNA с мишенью воздействие siRNA может привести к отбору устойчивых к siRNA вирусов, как это было продемонстрировано для ВИЧ (Das, A.T. *et al. J. Virol.* 78, 2601-2605 (2004)). Авторы пока не сталкивались с этой проблемой, используя siRNA, тестированные в настоящем документе. Вирусы, которые выделяли из легких мышей, леченных siRNA, выращивали в культуре клеток A549, и было обнаружено, что они имеют ту же самую IC50 для siRNA, что и первоначальный инокулят (данные не приведены). Кроме того, секвенирование региона гена Р siRNA в шести таких независимых очищенных с помощью бляшкообразования штаммов выявило родительскую последовательность дикого типа (данные не приведены). Даже если в будущем случайно встретится устойчивость в режиме, включающем несколько препаратов, может использоваться вторая siRNA с более низким IC50, нацеленная на другой регион Р мРНК или другую вирусную мРНК, тем самым снижая вероятность устойчивости вируса.

Методы

Вирус, siRNA и другие реагенты. RSV штамма Long и PIV человека типа 3 (HPIV3) штамма JS выращивали на монослое HEp-2, как описано для RSV (Burke, E., et al., *Virology* 252, 137-148 (1998), Burke, E., et al., *J. Virol.* 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72, 2655-2662 (1998)). Внеклеточную среду, содержащую высвобожденное потомство вируса, собирали примерно через 70 ч для RSV и 50 ч для HPIV3. Вирусы очищали и концентрировали осаждением полиэтиленгликолем (молекулярная масса 8000) и центрифугированием в градиенте сахарозы, как описано для RSV (Ueba,

O. Acta. Med. Okayama 32, 265-272 (1978)). Конечные препараты имели инфекционный титр в диапазоне 10^8 - 10^9 БОЕ/мл и хранились в мелкой расфасовке замороженными при -80°C . Все инфекционные титры вируса (БОЕ) определяли с помощью образования бляшек на агарозе с монослоем HEp-2 и окрашиванием нейтральным красным (Burke, E., et al., *Virology* 252, 137-148 (1998), Burke, E., et al., *J. Virol.* 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72, 2655-2662 (1998)).

siRNA были приобретены у Dharmacon и обработаны так, как рекомендовал производитель (Bitko, V. & Barik, S. *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001)). Реагент TransIT-TKO[®] был получен от Mirnisi Bio Corp (Madison, Wisconsin). Во всех иммуногистохимических реакциях использовали антитела RSV-P, полученные от кролика (Bitko, V. & Barik, S. *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001)). Поликлональные антитела к RSV и HPIV3 вырабатывались к очищенным вирионам у коз и были приобретены у Chemicon (Temecula, California) и BiosPacifica (Emeryville, California), соответственно; белок нуклеокапсида (N) представлял собой основную вирусную полосу, выявляемую данными антителами в иммуноблоттинге. Антитела к профилину также описаны (Burke, E., et al., *J. Virol.* 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72, 2655-2662 (1998)).

Вирусная инфекция и лечение siRNA. Заражение и обработку siRNA клеток A549, выращенных в монослое, выполняли, как описано (Bitko, V. & Barik, S. *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001)). Интраназальное введение RSV мышам - укоренившаяся процедура и вызывает бронхолит. Свободных от возбудителей самок мышей BALB/c в возрасте 8-10 недель, массой 16-20 г, приобрели у Charles River Laboratories. Анестезию для заражения или введения siRNA осуществляли интраперитонеальной инъекцией 0,2 мл нембутала (5 мг/мл). Эвтаназию выполняли путем смещения шеи после анестезии 0,3 мл нембутала. siRNA соответствующим образом разводили в буфере разведения, предоставленном производителем, до желаемого содержания в 1 мкл. Его смешивали с 5 мкл реагента TransIT-TKO[®] и 35 мкл Opti-MEM (Gibco Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA) сразу перед проведением эксперимента, чтобы получить общий объем 41 мкл. Если siRNA использовали без носителя, 5 мкл реагента для трансфекции заменяли 5 мкл Opti-MEM. Очищенный от сахарозы вирус соответствующим образом разводили в холодном фосфатно-солевом растворе (PBS) сразу перед заражением, так что 10^7 БОЕ вируса содержалось в 30 мкл. Для имитации заражения использовали такой же объем PBS, свободного от вируса. И смесь siRNA, и вирус поровну распределяли между ноздрями и вводили микропипеткой (то есть в каждую ноздрю вводили 35 мкг siRNA в 20,5 мкл и $0,5 \times 10^7$ БОЕ вируса в 15 мкл). Специального оборудования не требовалось, поскольку мыши вдыхали всю жидкость при естественном дыхании. Для смешанной инфекции исходные растворы RSV и HPIV3 разбавляли, так что каждая мышь получала смесь 10^7 БОЕ каждого вируса и смесь 5 нмоль (70 мкг) каждой siRNA#1 и siRNA#4 в указанных ранее объемах. Эксперименты на животных проводились согласно всем предписанным нормативам и были одобрены IACUC.

Определение вируса в легких и клиническое обследование. Животных ежедневно проверяли и измеряли их массу. Отмечали стандартные симптомы RSV, включая выделение слизи из носа, повышенную частоту дыхания вследствие прилива крови и бронхолита, тусклую шерсть, взъерошенный мех и/или выпадение волос, общую вялость и недомогание. Частоту дыхания (количество дыхательных движений в минуту) определяли с помощью видеозаписи (Volovitz, B., et al., *Pediatr. Res.* 24, 504-507 (1988)). Чиханье, обнюхивание и вздохание исключали из подсчета. Через различное

количество дней после инфицирования (p.i.) легкие удаляли для выявления RSV с помощью определения титра инфекционного вируса, иммуноблоттинга или иммуногистохимии, как описано ниже.

5 Чтобы определить титр вируса, легкие гомогенизировали в DMEM с добавкой 2% FBS (2 мл DMEM на 100 мг ткани) на холоду. Экстракт центрифугировали при 2000 g в течение 10 минут и последовательные разведения супернатанта исследовали на БОЕ. Для иммуноблоттинга вирусных белков (Burke, E., et al., *Virology* 252,137-148 (1998)) 10 мкл гомогенизированного образца (перед центрифугированием) добавляли к 10 мкл 10 2×SDS-PAGE буфера, смесь нагревали при 98°C в течение 5 минут, осветляли центрифугированием в микроцентрифуге при комнатной температуре, и 10 мкл прозрачного супернатанта анализировали иммуноблоттингом, используя козлиные антитела к RSV и HPIV3. Чтобы измерить IFN (Durbin, J.E. et al. *J. Immunol.* 168, 2944-2952 (2002)), легкие гомогенизировали в PBS, обрабатывали, как описано выше, и 15 последовательные разведения исследовали с помощью наборов для ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), предел определения которых составлял 10 пг/мл.

Для исследования гистопатологии легкие промывали и фиксировали в 10% забуференном формалине и заливали в парафин. Множественные срезы толщиной 4 20 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и два независимых исследователя под световым микроскопом оценивали клетки воспаления. Воспалительные инфильтраты оценивали, подсчитывая число слоев воспалительных клеток, окружающих сосуды и бронхиолы. От нуля до трех слоев клеток воспаления считали нормой, более трех слоев клеток воспаления, окружающих 50% и более окружности сосуда или 25 бронхиолы, считали патологией. Число патологических периваскулярных и перибронхиальных пространств, разделенное на общее число таких пространств, сообщали как патологический показатель. Для каждого животного подсчитывали все из примерно 20 пространств на каждое легкое. При 10⁷ RSV (и отсутствии siRNA) 30 (Haeberle, H.A. et al. *J. Virol.* 75, 878-890 (2001)) примерно 30-35% периваскулярных и перибронхиальных пространств могли быть патологическими в 1-й день, и их количество достигало пика примерно на 5-й день.

Для иммуногистологического исследования (Haeberle, H.A. et al. *J. Virol.* 75,878-890 (2001)) ткань легких погружали в 100% состав ОСТ и замораживали при -80°C. Срезы 35 разделяли на микроскопические препараты, высушивали на воздухе, фиксировали в ацетоне, промывали в PBS и повышали проницаемость в 0,2% Triton X-100 в PBS, блокировали в течение 20 минут 10% козьиной сывороткой в PBS при комнатной температуре. После многократных промывок PBS ткань инкубировали в течение 2 40 часов при комнатной температуре с антителами либо к RSV-P, либо к HPIV3, разбавленных PBS, содержащим 1,5% козьиной сыворотки. Препараты снова промывали в PBS и два антитела выявляли конъюгированными с FITC антителами к кроличьим антителам и конъюгированными с TRITC антителами к козьим антителам класса IgG. Через 1 час инкубации при комнатной температуре препараты 45 промывали PBS, заливали заливочной средой DABCO-DAPI и исследовали флуоресцентной микроскопией (Bitko, V. & Barik, S. *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001)).

Бронхоальвеолярный смыв (BALF) получали, промывая бронхи и легкие 5×1,0 мл физиологического раствора (содержащего 10 мгк индометацина на мл) (Bernhard, W. 50 et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25,725-731 (2001)); общий объем бронхоальвеолярного смыва на мышь составил 4,2-4,4 мл. Пробы, содержащие видимые признаки загрязнения кровью, отбрасывали. Клетки удаляли из BALF с помощью центрифугирования при 5000 g в течение 15 минут при 4°C, и пробы хранили при -80°C

до последующего анализа. Концентрацию в BALF конъюгатов цистеинил-лейкотриены определяли с помощью набора для ELISA, следуя протоколу изготовителя (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Согласно введенному продукту, перекрестная реактивность набора по отношению к различным лейкотриенам составляла LTC4 100%, LTD4 115%, LTE4 63% и LTB4 1,2%.

Для ПЦР-экспериментов в реальном времени РНК выделяли из инфицированных HPIV3 клеток, и первую цепь кДНК синтезировали, используя набор GeneAmp RNA PCR Core (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). Праймеры были сконструированы программой Beacon Designer 2.13 от Premier Biosoft. Для амплификации HPIV3 мРНК использовали следующие праймеры: 5'-GGTCATCACACGAATGTACAAC-3' (SEQ ID NO:1) и 5'-CTTGGAACATCTGCAGATTGTC-3' (SEQ ID NO:2). ПЦР в реальном времени выполняли на системе iCycler iQ Quantitative PCR от BioRad Laboratories (Hercules, California), используя iQ Sybr Green SuperMix. Результаты измерения экспрессии генов подсчитывали, используя программное обеспечение производителя и GAPDH в качестве внутреннего контроля.

Антисмысловую цепь siRNA экстрагировали из легких и определяли Нозерн-гибридизацией по существу, как описано (Reinhart, B.J., et al., *Genes & Dev.* 16,1616-1626 (2002)), используя комплементарные синтетические олигонуклеотиды, концы которых были помечены ³²P.

Статистический анализ. Различия между группами лечения или между наборами *in vitro* экспериментов анализировали с помощью однофакторного ANOVA и затем - *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Нарастание концентраций лейкотриена оценивали по критерию Манна-Уитни. Все числовые данные были получены по меньшей мере в 3 отдельных экспериментах. Результаты выражали как среднее $\pm$ SEM (величина ошибки на графиках). Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Таблица 1

Последовательности siRNA

Название (нМ)	Цель	SEQ ID NO:	Последовательность siRNA	IC50
5				
18	siRNA#1 RSV-P	3	5'-CGAUAAUUAUACUGCAAGAdTdT-3'	
10		4	3'-dTdTGCUAUUUAUUGACGUUCU-5'	
80	siRNA#2 RSV-P	5	5'-CCCUA <u>C</u> ACCAAGUGAUAAUdTdT-3'	
15		6	3'-dTdTGGGAUGUGGUUCACUAUUA-5'	
>300	siRNA#3 RSV-P	7	5'-GAUGCCAUGAUUGGUUUAAdTdT-3'	
20		8	3'-dTdTTCUACGGUACUAACCAAAUU-5'	
15	siRNA#4 HPIV3-P	9	5'-CGAGUUGUAUGUGUAGCAAdTdT-3'	
25		10	3'-dTdTGCUCAACAUAACAUUCGUU-5'	
>300	siRNA#5 HPIV3-P	11	5'-GAUAGACUCCUAGCAGGAdTdT-3'	
--		12	3'-dTdTTCUAUCUGAAGGAUCGUCCU-5'	
30	Luc-siRNA Люцифераза	13	5'-CGUACGCGGAUACUUCGAdTdT-3'	
--		14	3'-dTdTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU-5'	
	Отрицательный	15	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'	
--		16	3'-dTdTAAAGAGGCUUGCACAGUGCA-5'	
35				

Номера доступа GenBank для последовательностей RSV-P, HPIV3-P и люциферазы: M22644, Z11575 и X65324 соответственно. Обратите внимание, что последовательности siRNA были основаны на фактическом секвенировании вирусных штаммов в нашей лаборатории; таким образом, siRNA#2 отличается от последовательности GenBank одним нуклеотидом (подчеркнутый C представляет собой U в M22644). Отрицательная контрольная последовательность siRNA была получена от Qiagen (Valencia, California).

Формула изобретения

1. iРНК средство для снижения уровней вирусного белка, мРНК или титра респираторного синцитиального вируса в клетке дыхательных путей индивидуума, содержащее смысловую цепь и антисмысловую цепь, где указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, комплементарных гену Р вируса RSV, а антисмысловая цепь имеет по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, комплементарных указанной смысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит 15 или более последовательных нуклеотидов

последовательности, состоящей из нуклеотидов 1-19 последовательности SEQ ID NO:6.

2. iРНК средство по п.1, где указанная смысловая цепь содержит 15 или более последовательных нуклеотидов последовательности, состоящей из нуклеотидов 1-19 последовательности SEQ ID NO:5.

5 3. iРНК средство по п.1, где смысловая и антисмысловая цепи стабилизированы против нуклеотидной деградации.

4. iРНК средство по п.1, где по меньшей мере один нуклеотид по меньшей мере одной цепи представляет собой 2'-модифицированный нуклеотид.

10 5. iРНК средство по п.4, где указанный 2'-модифицированный нуклеотид содержит модификацию, выбранную из группы, состоящей из: 2'-метоксиэтил, 2'-OCH₃, 2'-O-аллил, 2'-C-аллил и 2'-фтор.

6. iРНК средство по п.5, где указанный 2'-модифицированный нуклеотид дополнительно содержит одну или более модификацию с фосфатным линкером.

15 7. iРНК средство по п.1, где указанная смысловая цепь и указанная антисмысловая цепь содержит 1-4 дезокситимидиновые остатки на 3'-конце.

8. iРНК средство по п.1, где антисмысловая цепь состоит из SEQ ID NO:6 и смысловая цепь состоит из SEQ ID NO:5.

20

25

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> University of South Alabama College of Medicine

<120> МОДУЛЯЦИЯ RSV, PIV И ДРУГИХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСОВ С
ПОМОЩЬЮ RNAI И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 18358-002WO1

<150> US 11/151,976

<151> 2005-06-14

<150> US 60/621,552

<151> 2004-10-22

<150> US 11/151,893

<151> 2005-06-14

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 22

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Праймер

<400> 1

ggtcattcaca cgaatgtaca ac

22

<210> 2

<211> 22

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Праймер

<400> 2

cttggaacat ctgcagattg tc

22

<210> 3

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>misc_feature

<222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 3
 cgauaaauaa acugsaagan n 21

<210> 4
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 4
 ucuugcaguu aaauuaucgn n 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 5
 cccuacacca agugaauaun n 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 6
 auuaucacuu gguguagggn n 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = дезокситимидин

<400> 7

gaugccauga uugguuuuuaan n

21

<210> 8

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = дезокситимидин

<400> 8

uuaaaaccaau cauggcacucn n

21

<210> 9

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = дезокситимидин

<400> 9

cgaguuguaau guguagcaan n

21

<210> 10

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Синтетический олигонуклеотид

<220>

<221>misc_feature

<222> 20, 21

<223> n = дезокситимидин

<400> 10
 uugcuacaca uacaacucgn n 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

 <400> 11
 gauagacuuu cuagcagga n 21

 <210> 12
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

 <400> 12
 uucugcuagg aagucuaucn n 21

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

 <400> 13
 cguacgcgga auacuuugan n 21

 <210> 14
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 14
 ucgaaguuu ccgcguacgn n 21

<210> 15
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

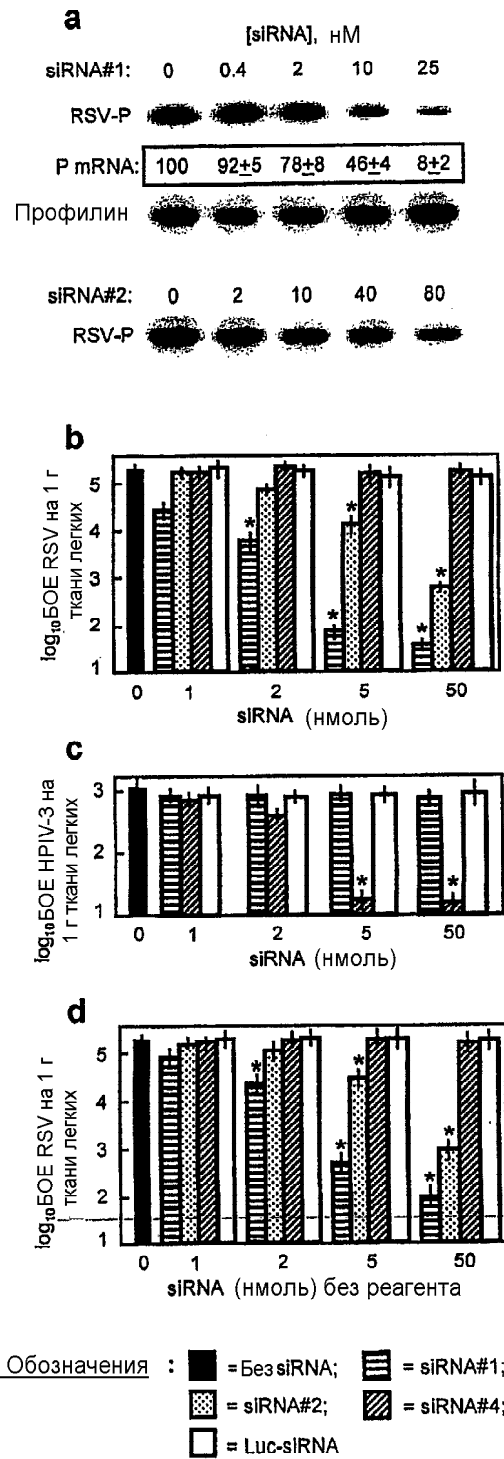
<400> 15
 uucuccgaac gugucacgn n 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

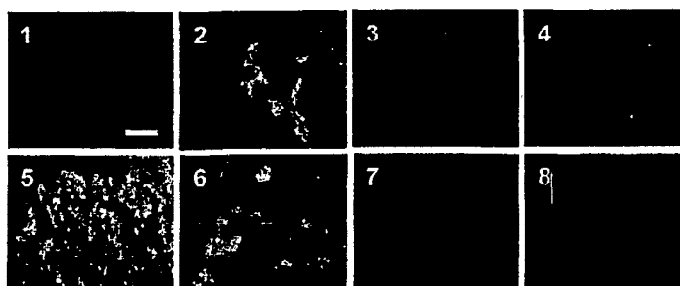
<220>
 <221>misc_feature
 <222> 20, 21
 <223> n = дезокситимидин

<400> 16
 acgugacacg uucggagaan n 21



ФИГ.1

a



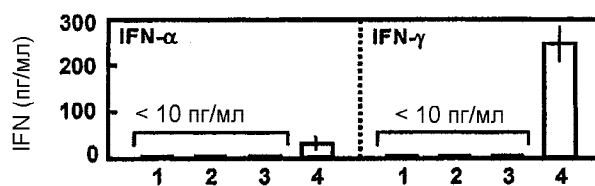
b

Общее количество РНК (нг): 450 150 50 450 450

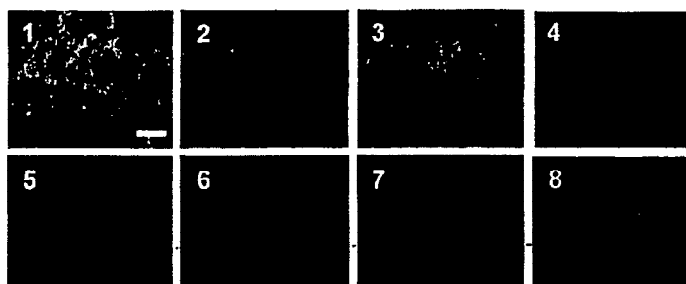


siRNA#1:	+	+	+	-	+
Генный зонд к RSV:	P	P	P	P	NS1

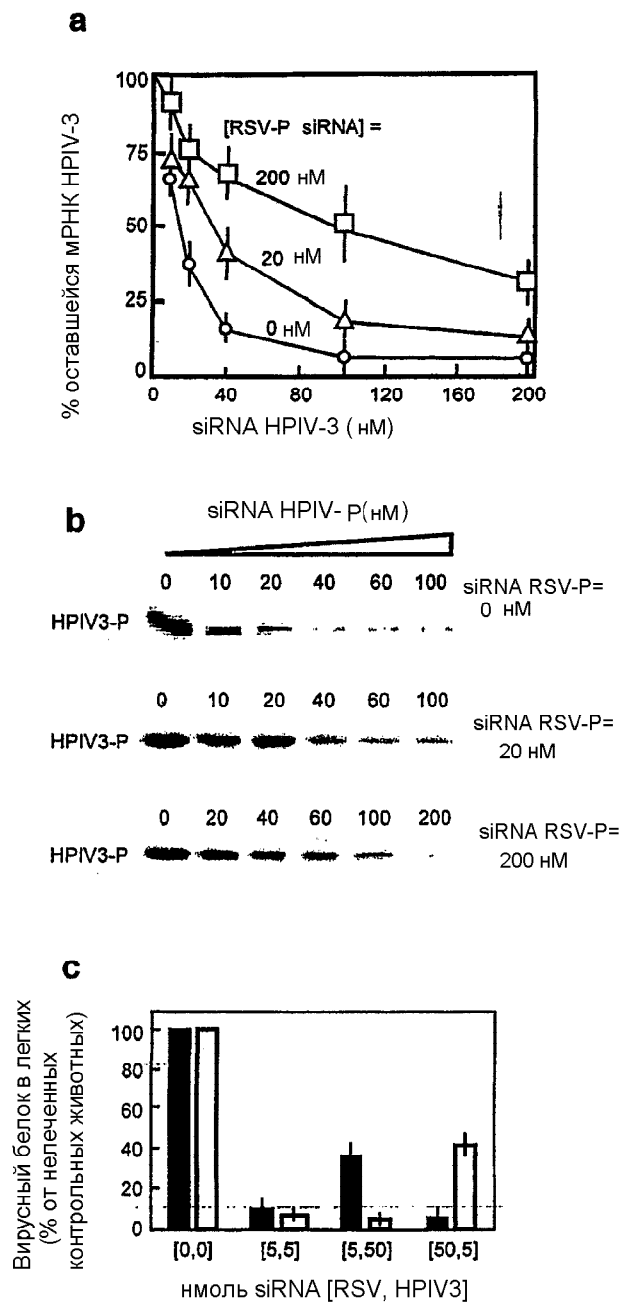
c



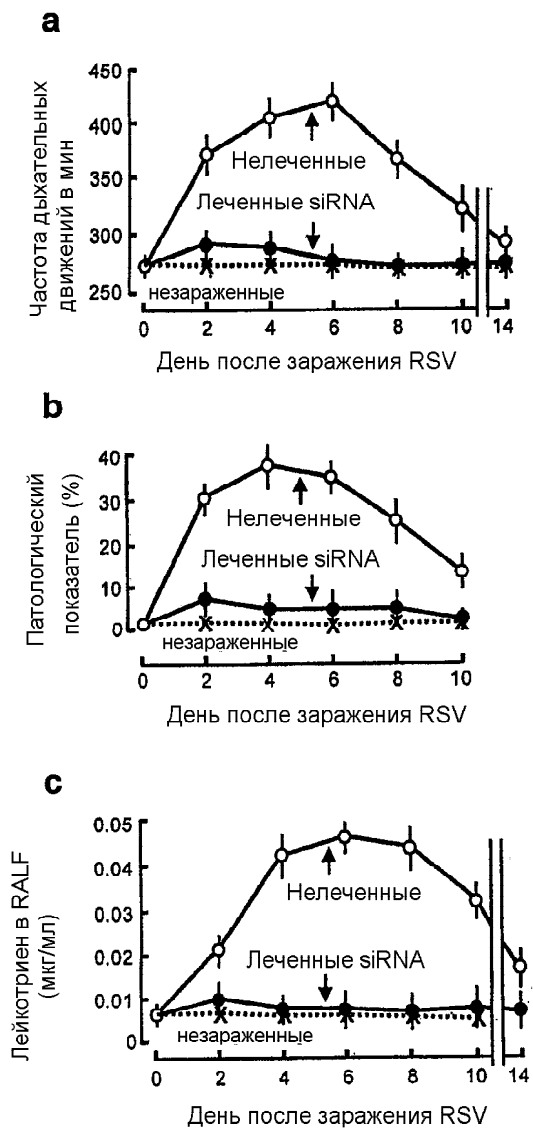
d



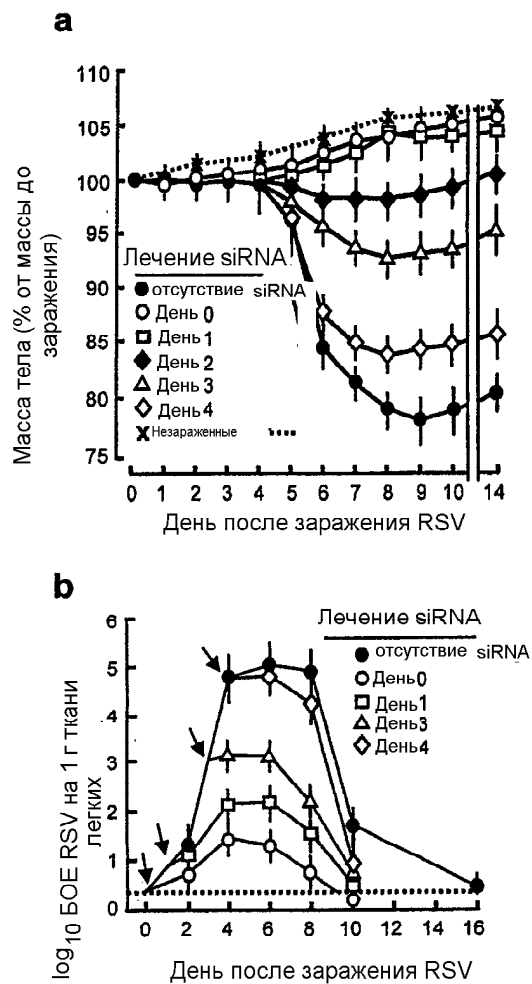
ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5