



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2019119242, 21.11.2017

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

23.11.2016 US 62/425,907;

23.08.2017 US 62/549,099;

22.08.2017 US 62/548,589;

21.09.2017 US 62/561,514

(43) Дата публикации заявки: 25.12.2020 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 24.06.2019

(86) Заявка РСТ:

US 2017/062701 (21.11.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2018/098117 (31.05.2018)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(71) Заявитель(и):

**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК.**  
(US)

(72) Автор(ы):

**ШЛЕГЕЛЬ, Марк, К. (US),  
ДЖАНАС, Майя (US),  
ДЖАДХАВ, Васант, Р. (US),  
ФОСТЕР, Дональд (US),  
МАНОХАРАН, Мутхиах (US),  
РАДЖИВ, Каллантхоттатхил, Г. (US),  
КЕЛИН, Александер, В. (US),  
ХАРИССЕ, Клаус (US),  
НАИР, Джаяпракаш, К. (US),  
МАЙЕР, Мартин, А. (US),  
МАЦУДА, Шигео (US),  
ДЖАЯРАМАН, Мутхусами (US),  
СЕХГАЛ, Алфика (US),  
БРАУН, Кристофер (US),  
ФИЦДЖЕРРАЛЬД, Кевин (US),  
МИЛСТЕЙН, Стюарт (US)****(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ IRNA SERPINA1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ****(57) Формула изобретения**

1. Средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA), которое ингибирует экспрессию гена ингибитора сериновой пептидазы, клады А, представителя 1 (Serpina1), содержащее смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:15,

при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию двухнитевого участка в пределах первых 9 положений нуклеотидов 5'-области или ее предшественника,

при этом указанная смысловая нить содержит лиганд ASGPR, и

при этом каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо имеет длину от 14 до 40 нуклеотидов.

2. Средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA), которое ингибирует экспрессию гена ингибитора сериновой пептидазы, клады А, представителя 1 (Serpina1), содержащее

смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, причем указанная антисмысловая нить содержит участок комплементарности с mRNA, кодирующей *Serpina1*, где участок комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:15,

при этом указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию в пределах первых 9 положений нуклеотидов 5'-области или ее предшественника,

при этом указанная смысловая нить содержит лиганд ASGPR,

при этом каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо имеет длину от 14 до 40 нуклеотидов.

3. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где средство на основе dsRNA содержит по меньшей мере четыре нуклеотида, содержащих 2'-фтор-модификацию.

4. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, соответствующее следующим характеристикам:

а) нарушающая термостабильность модификация находится в положении 4–8 5'-области антисмысловой нити;

б) каждая из смысловой и антисмысловой нитей независимо содержит по меньшей мере два нуклеотида, содержащих 2'-фтор-модификацию; и

с) лиганд ASGPR присоединен к каждому из концов смысловой нити.

5. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где антисмысловая нить соответствует по меньшей мере двум из следующих характеристик:

а) нарушающая термостабильность модификация находится в положении 4–8 антисмысловой нити;

б) по меньшей мере два нуклеотида содержат 2'-фтор-модификацию;

с) фосфотиоатная межнуклеотидная связь между положениями нуклеотидов 1 и 2 (считая от 5'-конца);

д) длина составляет от 18 до 35 нуклеотидов.

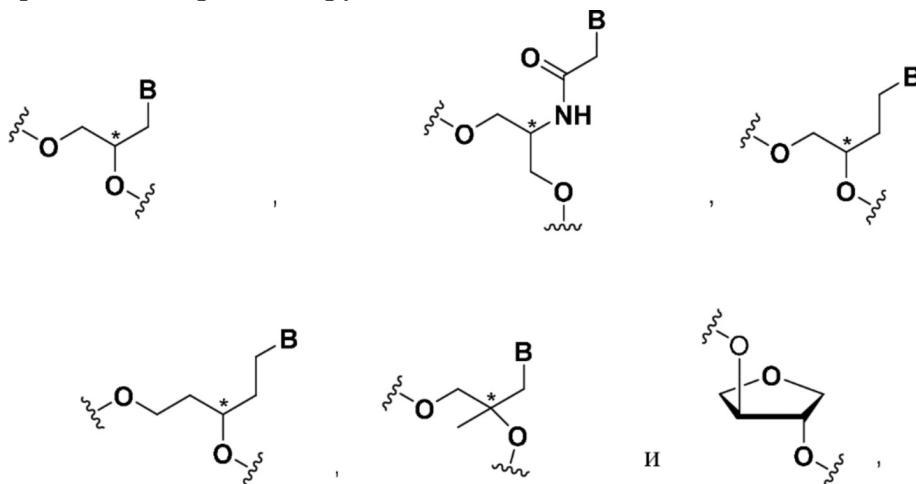
6. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где смысловая нить соответствует по меньшей мере одной из следующих характеристик:

а) лиганд ASGPR присоединен к каждому из концов смысловой нити;

б) по меньшей мере два нуклеотида содержат 2'-фтор-модификацию;

с) двухнитевой участок охватывает по меньшей мере 19 положений нуклеотидов, и при этом нарушающая термостабильность модификация находится в пределах указанного двухнитевого участка.

7. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где нарушающая термостабильность модификация выбрана из группы, состоящей из:

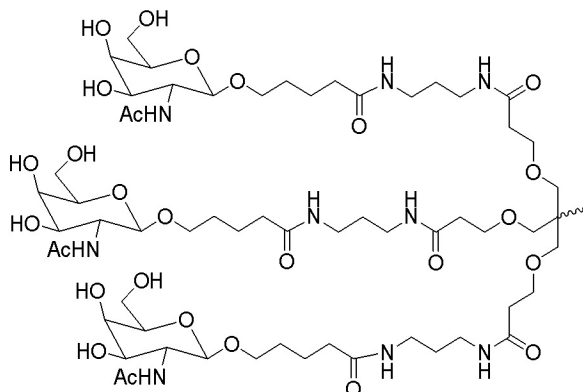


где В представляет собой нуклеотидное основание.

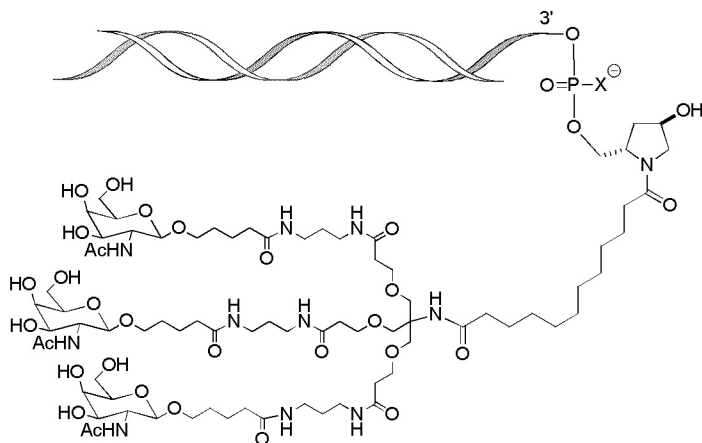
8. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где дестабилизирующая модификация находится в положении 7 антисмысловой нити.

9. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где лиганд ASGPR представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

10. Средство на основе dsRNA по п. 9, где лиганд ASGPR представляет собой:



11. Двухнитевое средство для RNAi по п. 10, где средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

12. Молекула двухнитевой РНК, которая ингибирует экспрессию последовательности целевого гена ингибитора сериновой пептидазы, кланды А, представителя 1 (Serpina1), содержащая смысловую нить и антисмысловую нить,

где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:15,

при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию в пределах первых 9 положений нуклеотидов 5'-области,

при этом каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо имеет длину от 14 до 40 нуклеотидов, и

при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C.

13. Молекула двухнитевой РНК, которая ингибирует экспрессию последовательности целевого гена ингибитора сериновой пептидазы, кланды А, представителя 1 (Serpina1), содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, причем указанная антисмысловая

нить содержит участок комплементарности с mRNA, кодирующей *Serpina1*, где участок комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:15, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность модификацию в пределах первых 9 положений нуклеотидов 5'-области,

при этом каждая из смысловой нити и антисмысловой нити независимо имеет длину от 14 до 40 нуклеотидов, и

при этом dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 40°C до приблизительно 80°C.

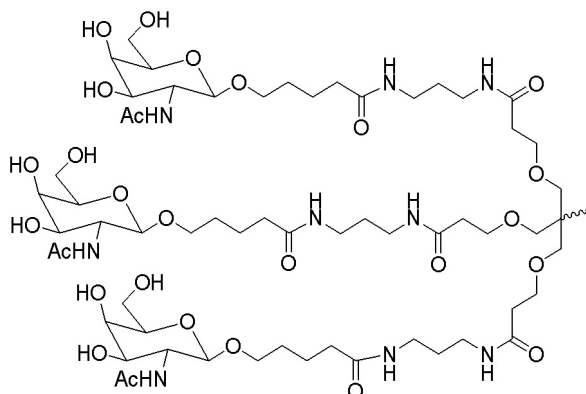
14. Средство на основе dsRNA по п. 12 или 13, где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 55°C до приблизительно 67°C.

15. Средство на основе dsRNA по п. 14, где dsRNA характеризуется температурой плавления от приблизительно 60°C до приблизительно 67°C.

16. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 12–14, дополнительно содержащее лиганд ASGPR.

17. Средство на основе dsRNA по п. 16, где лиганд ASGPR представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

18. Средство на основе dsRNA по п. 17, где лиганд ASGPR представляет собой:



19. Двухнитевое средство для RNAi по п. 18, где средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:

ам,

где X представляет собой O или S.

20. dsRNA по любому из пп. 1–19, где dsRNA дополнительно соответствует по меньшей мере одной из следующих характеристик:

(i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификации;

(ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи;

(iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом;

(iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию;

(v) смысловая нить содержит 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатные межнуклеотидные связи;

(vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре нуклеотида, содержащих 2'-фтор-модификацию;

(vii) dsRNA содержит двухнитевой участок с длиной, составляющей 12–40 пар нуклеотидов; и

(viii) тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

21. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1–4 или пп. 7–20, где каждая нить содержит 15–30 нуклеотидов.

22. Средство на основе ddRNA по любому из пп. 1–4 или пп. 7–20, где каждая нить содержит 19–30 нуклеотидов.

23. Средство на основе dsRNA по любому из пп. 1–20, где смысловая нить содержит 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит 23 нуклеотида.

24. Средство на основе dsRNA по п. 2, где антисмысловая нить содержит участок комплементарности, содержащий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидов 1440–1480 из SEQ ID NO: 1.

25. Средство на основе dsRNA по п. 2, где участок комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности 5' – UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3' (SEQ ID NO: 419).

26. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – CUUCUAAUGAUUGAACAAAA – 3' (SEQ ID NO: 417), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – UUUUGUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3' (SEQ ID NO: 419).

27. Средство на основе dsRNA по п. 1 или 2, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa – 3' (SEQ ID NO: 33), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – usUfsuugu (Tgn)сааусаUfuAfаgааgаsас – 3' (SEQ ID NO: 34),

при этом а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, C и U соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, G, C и U соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; и (Tgn) представляет собой S-изомер нуклеиновой кислоты с тимидингликолевыми остатками (GNA).

28. Молекула двухнитевой РНК (dsRNA), которая ингибирует экспрессию гена ингибитора сериновой пептидазы, клады А, представителя 1 (Serpina1), содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaaL96–3' (SEQ ID NO: 35), и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность 5' – usUfsuugu(Tgn)сааусаUfuAfаgааgаsас – 3' (SEQ ID NO: 34),

при этом а, g, с и u представляют собой 2'-О-метил-модифицированные (2'-ОМе) А, G, C и U соответственно; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой 2'-фтор-модифицированные А, G, C и U соответственно; s представляет собой фосфотиоатную связь; (Tgn) представляет собой S-изомер нуклеиновой кислоты с тимидингликолевыми остатками (GNA); и L96 представляет собой N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканол]-4-гидроксипролин.

29. Вектор, содержащий средство на основе dsRNA по любому из пп. 1–28.

30. Клетка, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1–28.

31. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе dsRNA по любому из пп. 1–28.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, где средство для RNAi вводится в незабуференном растворе.

33. Фармацевтическая композиция по п. 32, где указанный незабуференный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

34. Фармацевтическая композиция по п. 31, где указанная siRNA вводится с буферным раствором.

35. Фармацевтическая композиция по п. 34, где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

36. Фармацевтическая композиция по п. 34, где указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

37. Способ ингибирования экспрессии *Serpina1* в клетке, при этом способ предусматривает приведение клетки в контакт со средством на основе dsRNA по любому из пп. 1–28, вектором по п. 29 или фармацевтической композицией по любому из пп. 31–36, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена *Serpina1* в клетке.

38. Способ по п. 37, где указанная клетка находится в организме субъекта.

39. Способ по п. 38, где субъектом является человек.

40. Способ по любому из пп. 37–39, где экспрессия *Serpina1* ингибируется на по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 100%.

41. Способ лечения субъекта, у которого имеется ассоциированное с *Serpina1* заболевание, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе dsRNA по любому из пп. 1–28, вектора по п. 29 или фармацевтической композиции по любому из пп. 31–36, за счет чего осуществляется лечение указанного субъекта.

42. Способ по п. 41, где субъектом является человек.

43. Способ по п. 41, где ассоциированное с *Serpina1* заболевание представляет собой нарушение функции печени.

44. Способ по п. 43, где нарушение функции печени выбрано из группы, состоящей из хронического заболевания печени, воспаления печени, цирроза, фиброза печени и/или гепатоцеллюлярной карциномы.

45. Способ по п. 41, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

46. Способ по п. 45, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

47. Способ по п. 41, где двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно.

48. Способ по п. 41, где двухнитевое средство для RNAi вводят внутривенно.

49. Способ по п. 41, где указанное средство для RNAi вводят в двух или более дозах.

50. Способ ингибирования развития гепатоцеллюлярной карциномы у субъекта с дефектным вариантом *Serpina1*, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе dsRNA по любому из пп. 1–28, вектора по п. 29 или фармацевтической композиции по любому из пп. 31–36, за счет чего обеспечивается ингибирование развития гепатоцеллюлярной карциномы у субъекта.

51. Способ по п. 50, где субъектом является примат или грызун.

52. Способ по п. 50, где субъектом является человек.

53. Способ по п. 50, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

54. Способ по п. 53, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

55. Способ по п. 50, где указанное средство для RNAi вводят в двух или более дозах.

56. Способ по п. 50, где двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно.

57. Способ по п. 50, где двухнитевое средство для RNAi вводят внутривенно.

58. Способ снижения накопления неправильно свернутого *Serpina1* в печени субъекта с дефектным вариантом *Serpina1*, предусматривающий введение субъекту терапевтически

эффективного количества средства на основе dsRNA по любому из пп. 1–28, вектора по п. 29 или фармацевтической композиции по любому из пп. 31–36, за счет чего осуществляется снижение накопления неправильно свернутого Serpina1 в печени субъекта.

59. Способ по п. 58, где субъектом является примат или грызун.

60. Способ по п. 58, где субъектом является человек.

61. Способ по п. 58, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

62. Способ по п. 61, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

63. Способ по п. 58, где указанное средство для RNAi вводят в двух или более дозах.

64. Способ по п. 58, где двухнитевое средство для RNAi вводят подкожно.

65. Способ по п. 58, где двухнитевое средство для RNAi вводят внутривенно.

RU 2019116102 A 242222

RU 2019119242 A