

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092726** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.04.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.05.14

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ИРНК ПРОТИВ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (AGT) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/671,094; 62/727,141; 62/816,996

(32) 2018.05.14; 2018.09.05; 2019.03.12

(33) US

(86) PCT/US2019/032150

(87) WO 2019/222166 2019.11.21

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

(72) Изобретатель:  
Фостер Дональд, Хинкл Грегори,  
Шлегель Марк К. (US)

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

---

(57) Настоящее изобретение относится к средствам для РНКи, например к средствам на основе двухнитевой РНК (дсРНК), нацеливающимся на ген AGT. Настоящее изобретение также относится к способам применения таких средств для РНКи для подавления экспрессии гена AGT и к способам предупреждения и лечения нарушения, ассоциированного с AGT, например высокого кровяного давления.

**202092726**  
**A1**

**202092726**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565892EA/032

### КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ИРНК ПРОТИВ АНГИОТЕНЗИНОГЕНА (АГТ) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### Родственные заявки

Настоящая заявка является родственной с предварительной заявкой на патент США № 62/671094, поданной 14 мая 2018 г., предварительной заявкой на патент США № 62/727141, поданной 5 сентября 2018 г., и предварительной заявкой патент США № 62/816996, поданной 12 марта 2019 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством ссылки.

#### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 3 мая 2019 г., имеет название 121301\_08620\_SL.txt, и ее размер составляет 272488 байт.

#### Уровень техники

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (RAAS) играет важнейшую роль в регуляции кровяного давления. Каскад RAAS начинается с высвобождения ангиотензиногена из печени и ренина юкстагломерулярными клетками почек в системный кровоток. Секреция ренина стимулируется несколькими факторами, в том числе содержанием  $\text{Na}^+$  в дистальном канальце,  $\beta$ -симпатической стимуляцией или снижением почечной перфузии. Активный ренин в плазме расщепляет ангиотензиноген (вырабатываемый печенью) до ангиотензина I, который затем превращается циркулирующим и локально экспрессируемым ангиотензинпревращающим ферментом (ACE) в ангиотензин II. Большинство эффектов ангиотензина II, оказываемых на RAAS, проявляется путем его связывания с рецепторами 1-го типа ангиотензина II ( $\text{AT}_1\text{R}$ ), что приводит к сужению просвета артерий, эффектам в отношении канальцев и клубочка, таким как усиление реабсорбции  $\text{Na}^+$  или изменение скорости клубочковой фильтрации. Кроме того, вместе с другими стимулами, такими как адренокортикотропин, антидиуретический гормон, катехоламины, эндотелин, серотонин и уровни  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ , стимуляция  $\text{AT}_1\text{R}$  приводит к высвобождению альдостерона, что, в свою очередь, стимулирует экскрецию  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в дистальном извитом канальце почки.

Нарушение регуляции RAAS, приводящее, например, к чрезмерной выработке ангиотензина II или стимуляции  $\text{AT}_1\text{R}$ , приводит к гипертензии, которая может приводить, например, к повышенному окислительному стрессу, стимуляции развития воспаления, гипертрофии и фиброзу сердца, почек и артерий и приводит, например, к фиброзу левого желудочка, ремоделированию артерий и гломерулосклерозу.

В развитых странах гипертензия является наиболее распространенным контролируемым заболеванием, поражающим 20-50% взрослого населения. Гипертензия является главным фактором риска развития различных заболеваний, нарушений и

патологических состояний, таких как сокращение ожидаемой продолжительности жизни, хроническое заболевание почек, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризмы (например, аневризма аорты), заболевание периферических артерий, поражение сердца (например, увеличение или гипертрофия сердца) и другие сердечно-сосудистые заболевания, нарушения или патологические состояния. Кроме того, было показано, что гипертензия является важным фактором риска заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями и смертности по их причине, при этом она вызывает или вносит вклад в 62% всех случаев инсульта и 49% всех случаев сердечных заболеваний. В 2017 году были составлены изменения в руководствах по диагностике, предупреждению и лечению гипертензии, в которых были поставлены цели по еще большему снижению кровяного давления для дополнительного снижения риска развития заболеваний и нарушений, ассоциированных с гипертензией (см., например, Reboussin *et al.* Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004; и Whelton *et al.* (2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006).

Несмотря на целый ряд гипотензивных лекарственных средств, доступных для лечения гипертензии, у более двух третей субъектов ее не получается контролировать лишь одним гипотензивным средством, и они нуждаются в двух или более гипотензивных средствах, выбранных из разных классов лекарственных средств. Это дополнительно снижает количество субъектов с контролируемым кровяным давлением, поскольку при увеличении количества лекарственных препаратов снижается соблюдение предписанного режима лечения и увеличивается число побочных эффектов.

### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего ангиотензиноген (AGT). AGT может находиться в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-человек.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) для подавления экспрессии ангиотензиногена (AGT), где средство на основе дсРНК содержит **смысловую нить и антисмысловую нить**, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности, состоящей из любых из нуклеотидов 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-

1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303 или 2282-2304 из SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из любых из нуклеотидов 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303 или 2282-2304 из SEQ ID NO:1. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2.

В определенных вариантах осуществления **антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.** В определенных вариантах осуществления **смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.** В определенных вариантах осуществления **смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.**

В определенных вариантах осуществления **антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности**

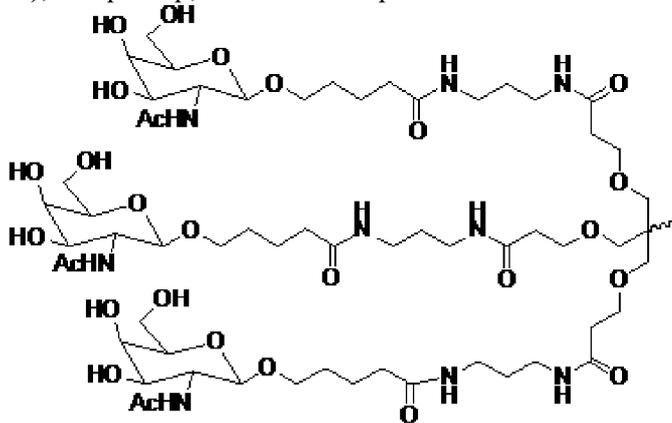
**антисмысловой нити из AD-85481 (5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO: 9)).** В определенных вариантах осуществления **смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидных последовательностей смысловой нити из AD-85481 (5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO: 10)).** В определенных вариантах осуществления **смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности** смысловой и антисмысловой нитей из AD-85481 (5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO: 9) и 5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO: 10)).

В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В определенных вариантах осуществления практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, нарушающего термостабильность нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления модификации в нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила, GNA и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления модификации в нуклеотидах представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций. В определенных вариантах

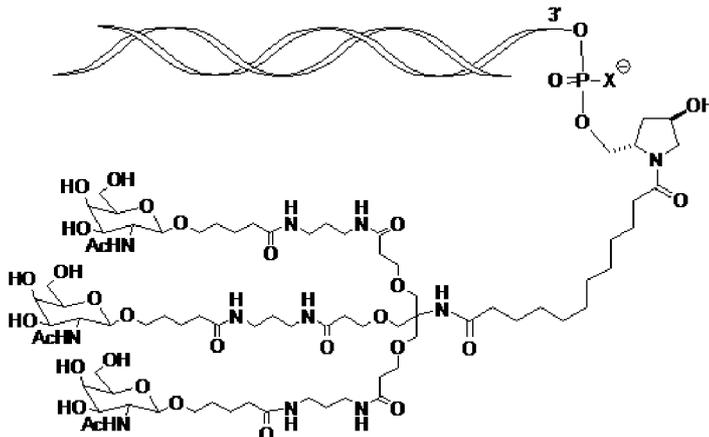
осуществления по меньшей мере одна из модификаций нуклеотида представляет собой нарушающую термостабильность модификацию нуклеотида. В определенных вариантах осуществления нарушающая термостабильность модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из модификации с удалением азотистого основания; ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в дуплексе и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксидификации, ациклического нуклеотида, незапертых нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

В определенных вариантах осуществления длина двухнитевого участка составляет 19-21 нуклеотид. В определенных вариантах осуществления длина двухнитевого участка составляет 21 нуклеотид. В определенных вариантах осуществления длина каждой нити средства на основе дсРНК независимо составляет не более 30 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить средства на основе дсРНК содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида или по меньшей мере 2 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК дополнительно содержит лиганд. В определенных вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити средства на основе дсРНК. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc), например, где лиганд представляет собой



В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S, например, где X представляет собой O.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, у которого антисмысловая нить содержит участок комплементарности с мРНК, кодирующей AGT человека, где участок комплементарности содержит по меньшей мере 19 нуклеотидов одной из последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок комплементарности с мРНК, кодирующей AGT человека, где участок комплементарности содержит любую из последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385. В определенных вариантах осуществления участок комплементарности состоит из любой из последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, где антисмысловая нить содержит химически модифицированную нуклеотидную последовательность из дуплекса, **выбранного из группы, состоящей из** AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, где антисмысловая нить содержит химически модифицированную нуклеотидную последовательность из дуплекса AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11)), где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-О-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-О-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-О-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-фторуридин-3'-фосфат соответственно; dT представляет дезокситимин; s представляет собой фосфотиоатную связь; и (Tgn) представляет собой S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, где антисмысловая нить и смысловая нить содержат химически модифицированные нуклеотидные последовательности из дуплекса, **выбранного из группы, состоящей из** AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD-133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, где антисмысловая нить и смысловая нить содержат химически модифицированные нуклеотидные последовательности из дуплекса AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11) и 5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3' (SEQ ID NO: 12)), где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-О-фтораденозин-3'-фосфат, 2'-О-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-О-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-фторуридин-3'-фосфат соответственно; dT представляет дезокситимин; s представляет собой фосфотиоатную связь; и (Tgn) представляет собой S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), и где 3'-конец смысловой нити необязательно конъюгирован с лигандом N-[трис(GalNAc-алкил)амидодеканол]-4-гидроксипропиолом (L96).

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено средство на основе дсРНК, где антисмысловая нить и смысловая нить состоят из химически модифицированных нуклеотидных последовательностей из дуплекса AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11) и 5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3' (SEQ ID NO: 12)), где 3'-конец смысловой нити конъюгирован с лигандом N-[трис(GalNAc-алкил)амидодеканол]-4-гидроксипропиолом (L96), где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин-3'-фосфат, 2'-О-метилцитидин-3'-фосфат, 2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-метилуридин-3'-фосфат соответственно;

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-О-фторадеозин-3'-фосфат, 2'-О-фторцитидин-3'-фосфат, 2'-О-фторгуанозин-3'-фосфат и 2'-О-фторуридин-3'-фосфат соответственно; dT представляет дезокситимин; s представляет собой фосфотиоатную связь; и (Tgn) представляет собой S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA).

В определенных вариантах осуществления длина двухнитевого участка средства на основе дсРНК составляет приблизительно 19-30 пар нуклеотидов, приблизительно 19-25 пар нуклеотидов, приблизительно 23-27 пар нуклеотидов, приблизительно 19-23 пары нуклеотидов, приблизительно 21-23 пары нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления длина каждой нити средства на основе дсРНК независимо составляет 19-30 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В определенных вариантах осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити. В определенных вариантах осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В определенных вариантах осуществления нить представляет собой смысловую нить. В определенных вариантах осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити. В определенных вариантах осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В определенных вариантах осуществления нить представляет собой смысловую нить. В определенных вариантах осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити. В определенных вариантах осуществления нить представляет собой антисмысловую нить.

В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК в 1 положении 5'-конца антисмысловой нити дуплекса содержит пару оснований, которая представляет собой пару оснований AU.

В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК содержит смысловую нить, имеющую в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловую нить, имеющую в общей сложности 23 нуклеотида.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка, содержащая средство на основе дсРНК по настоящему изобретению.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция для подавления экспрессии гена, кодирующего AGT, содержащая средство на основе дсРНК по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит средство на основе дсРНК и липидный состав.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ подавления экспрессии гена AGT в клетке, при этом способ предусматривает:

(a) приведение клетки в контакт со средством на основе дсРНК или фармацевтической композицией по настоящему изобретению и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для осуществления разрушения мРНК-транскрипта гена AGT, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена AGT в клетке.

В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления у субъекта было диагностировано нарушение, ассоциированное с AGT.

В определенных вариантах осуществления нарушение, ассоциированное с AGT, выбрано из высокого кровяного давления, гипертензии, пограничной гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, изолированной систолической или диастолической гипертензии, гипертензии, ассоциированной с беременностью, диабетической гипертензии, резистентной гипертензии, рефрактерной гипертензии, пароксизмальной гипертензии, реноваскулярной гипертензии, гипертензии Гольдблатта, глазной гипертензии, глаукомы, легочной гипертензии, портальной гипертензии, системной венозной гипертензии, систолической гипертензии, лабильной гипертензии; гипертензивной болезни сердца, гипертензивной нефропатии, атеросклероза, артериосклероза, васкулопатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии, диабетической сердечной миопатии, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочка, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, стенокардии, инсульта, заболевания почек, почечной недостаточности, системного склероза, задержки внутриутробного развития (IUGR), задержки развития плода, ожирения, стеатоза печени/жировой печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); непереносимости глюкозы, диабета 2-го типа (инсулинонезависимого диабета) и метаболического синдрома.

В определенных вариантах осуществления субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 130 мм рт. ст. или диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст. В определенных вариантах осуществления субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 140 мм рт. ст. и диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст. В определенных вариантах осуществления субъект является частью группы, предрасположенной к развитию солечувствительности, имеет избыточный вес, имеет ожирение или является беременной женщиной.

В определенных вариантах осуществления приведение клетки в контакт со средством на основе дсРНК подавляет экспрессию AGT на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% (например, по сравнению с уровнем экспрессии AGT до первого приведения клетки в контакт со средством на основе дсРНК; например, до введения субъекту первой дозы средства на основе дсРНК). В определенных вариантах

осуществления подавление экспрессии AGT приводит к снижению уровня белка AGT в образце(-ах) сыворотки крови субъекта на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, например, по сравнению с уровнем экспрессии AGT до первого приведения клетки в контакт со средством на основе дсРНК.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения нарушения, ассоциированного с AGT, у субъекта, предусматривающий введение субъекту средства на основе дсРНК или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается лечение нарушения, ассоциированного с AGT, у субъекта. В определенных вариантах осуществления субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 130 мм рт. ст. или диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст. В определенных вариантах осуществления субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 140 мм рт. ст. и диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления субъект является частью группы, предрасположенной к развитию солечувствительности, имеет избыточный вес, имеет ожирение или является беременной женщиной.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения средство на основе дсРНК вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления средство на основе дсРНК вводят субъекту подкожно. В определенных вариантах осуществления у субъекта измеряют уровень AGT. В определенных вариантах осуществления уровень AGT у субъекта представляет собой уровень белка AGT в образце(-ах) крови, образце(-ах) сыворотки крови или образце(-ах) мочи субъекта.

В определенных вариантах осуществления субъекту вводят дополнительное терапевтическое средство для лечения гипертензии. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из диуретика, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (ACE), антагониста рецептора ангиотензина II, бета-блокатора, вазодилататора, блокатора кальциевых каналов, антагониста альдостерона, альфа-2-агониста, ингибитора ренина, альфа-блокатора, адренергического средства периферического действия, селективного частичного агониста рецептора D1, неселективного антагониста альфа-адренергических рецепторов, синтетического и стероидного антиминералокортикоидного средства или комбинации любого из вышеперечисленных, а также гипотензивного терапевтического средства, составленного в виде комбинации средств. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство содержит антагонист рецептора ангиотензина II, например, лозартан, валсартан, олмесартан, эпросартан и азилсартан. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор рецептора ангиотензина-неприлизина (ARNi), например, Entresto®, сакубитрил/валсартан; или антагонист рецептора эндотелина (ERA), например, ситаксентан, амбрисентан, атрасентан, BQ-123, зиботентан, босентан, мацитентан и

тезосентан.

В настоящем изобретении также предусмотрены пути применения средств на основе дсРНК и фармацевтических композиций, предусмотренных в данном документе, для лечения нарушения, ассоциированного с AGT. В определенных вариантах осуществления пути применения включают любой из способов, предусмотренных в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении предусмотрены наборы, содержащие средство на основе дсРНК по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены наборы для реализации на практике способа по настоящему изобретению.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фигуре 1A представлен график, на котором показаны уровни белка AGT в сыворотке крови яванских макаков (n=3 на группу), обработанных однократной дозой 3 мг/кг указанных онРНК. Уровни AGT показаны в виде процента от уровня AGT до обработки.

На фигуре 1B представлен график, на котором показаны уровни белка AGT в сыворотке крови яванских макаков (n=3 на группу), обработанных однократной дозой 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг AD-85481 или AD-67327 в день 1. Уровни AGT показаны в виде процента от уровня AGT до обработки.

На фигуре 1C представлен график, на котором показаны уровни белка AGT в сыворотке крови яванских макаков (n=3 на группу), которым вводили дозу 1 мг/кг AD-85481 или AD-67327 один раз в четыре недели на протяжении трех доз. Уровни AGT показаны в виде процента от уровня AGT до обработки.

На фигурах 2A-2G показаны результаты различных параметров в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией (n=9 на группу), обработанных средой-носителем, валсартаном (31 мг/кг/день), онРНК, специфической для AGT крыс (10 мг/кг q2w), каптоприлом (100 мг/кг/день), валсартаном и каптоприлом или валсартаном и AGT-онРНК.

На фигуре 2A показаны уровни AGT в плазме крови в начале (столбики со сплошной заливкой) и в конце (столбики с пунктирной заливкой) исследования (через четыре недели).

На фигуре 2B показаны ежедневные показатели кровяного давления относительно показателей на исходном уровне.

На фигуре 2C представлен график, на котором показаны отношения массы сердца к длине большеберцовой кости.

На фигуре 2D представлен график, на котором показан уровень активности ренина в плазме крови в начале (столбики со сплошной заливкой) и в конце (столбики с пунктирной заливкой) исследования (через четыре недели).

На фигуре 2E представлен график, на котором изображена зависимость отношения массы сердца к длине большеберцовой кости от среднего артериального давления (МАР) в мм рт. ст.

На фигуре 2F представлен график размеров кардиомиоцитов.

На фигуре 2G представлен график уровней N-концевого пропептида b-типа натрийуретического гормона b-типа (NT-proBNP).

На фигуре 3 представлен график, на котором показаны уровни AGT в моче в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 4A представлен график, на котором показан уровень Ang I в крови в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 4B представлен график, на котором показан уровень Ang II в крови в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 4C представлен график, на котором показано отношение уровня Ang II в крови к уровню Ang I в крови в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 5A представлен график, на котором показан уровень Ang I в почках в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 5B представлен график, на котором показан уровень Ang II в почках в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 5C представлен график, на котором показано отношение уровня Ang II в почках к уровню Ang I в почках в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 6A представлен график, на котором показан уровень рецептора 1a ангиотензина в корковом и мозговом веществе почек в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 6B представлен график, на котором показан уровень рецептора 1b ангиотензина в корковом и мозговом веществе почек в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 6C представлен график, на котором показан уровень ACE в корковом и мозговом веществе почек в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 7 представлен график, на котором показан объем мочи на исходном уровне и через 4 недели после начала обработки в исследовании на крысах со спонтанной гипертензией.

На фигуре 8A представлен график, на котором показаны средние значения массы тела мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров (DIO), и мышей, которых кормили нормальным кормом (n=5 на группу), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS.

На фигуре 8B представлен график, на котором показаны конечные значения массы печени, жировой ткани и мышечной ткани у мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров (DIO), и мышей, которых кормили нормальным кормом (n=5 на группу), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS.

На фигуре 9A представлен график, на котором показаны изменения уровней глюкозы в плазме крови (мг/дл) у мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров (DIO), и мышей, которых кормили нормальным кормом (n=5 на группу), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS на

неделе 0 до первой дозы обработки.

На фигуре 9B представлен график, на котором показаны уровни глюкозы в плазме крови (мг/дл) у мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров (DIO), и мышей, которых кормили нормальным кормом (n=5 на группу), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS на неделе 6 эксперимента.

На фигуре 9C представлен график, на котором показаны уровни глюкозы в плазме крови (мг/дл) у мышей с ожирением, индуцированным рационом с высоким содержанием жиров (DIO), и мышей, которых кормили нормальным кормом (n=5 на группу), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS на неделе 12 эксперимента.

На фигуре 10A представлен график, на котором показаны средние значения массы тела мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD).

На фигуре 10B представлен график, на котором показаны средний совокупный прирост массы мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD).

На фигурах 11A-11C представлены графики, на которых показано содержание ферментов печени в сыворотке крови у мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или у мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD), в неделю 20 эксперимента.

На фигуре 11A представлен график, на котором показаны уровни аланинтрансаминазы (ALT) у мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или у мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD).

На фигуре 11B представлен график, на котором показаны уровни аспартаттрансаминазы (ALT) у мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или у мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD).

На фигуре 11C представлен график, на котором показаны уровни глутаматдегидрогеназы (GLDH) у мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HF<sub>r</sub>), обработанных либо средством на основе дсРНК против AGT, либо PBS, или у мышей, которых кормили нормальным кормом (LFD).

### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепления РНК-транскриптов гена AGT. Ген может находиться в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как человек. Применение этих иРНК обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК соответствующего гена (гена AGT) у млекопитающих.

иРНК по настоящему изобретению были разработаны для нацеливания на ген AGT человека, включая части гена, которые являются консервативными среди ортологов AGT других видов млекопитающих. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что комбинация или подкомбинация вышеуказанных свойств и специфических целевых сайтов или специфических модификаций в этих иРНК обеспечивает улучшенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность иРНК по настоящему изобретению.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения и предупреждения нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии, с применением композиции на основе иРНК, которая воздействует на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена AGT.

Средства на основе иРНК по настоящему изобретению содержат нить РНК (антисмысловую нить), имеющую участок, длина которого составляет не более приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, причем этот участок практически полностью комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена AGT.

В определенных вариантах осуществления длина одной или обеих нитей двухнитевых средств для РНКи по настоящему изобретению составляет не более 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, при этом она имеет участок из по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, который практически полностью комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена AGT. В некоторых вариантах осуществления такие средства на основе иРНК, имеющие антисмысловые нити большей длины, предпочтительно могут содержать вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение иРНК по настоящему изобретению обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК соответствующего гена (гена AGT) у млекопитающих. С помощью анализов *in vitro* и *in vivo* авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что иРНК, нацеливающиеся на ген AGT, способны опосредовать РНКи, что приводит к значительному подавлению экспрессии AGT. Подавление экспрессии AGT у такого субъекта будет предупреждать развитие нарушения,

ассоциированного с AGT, например, гипертензии, или осуществлять его лечение. Таким образом, способы и композиции, содержащие эти иРНК, применимы для предупреждения и лечения субъекта, предрасположенного к развитию нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии, или субъекта, у которого оно было диагностировано. Способы и композиции в данном документе применимы для снижения уровня AGT у субъекта.

В нижеследующем подробном описании раскрыто, как получать и применять композиции, содержащие иРНК, для подавления экспрессии гена AGT, а также композиции, пути применения и способы лечения субъектов, которые будут получать пользу от снижения экспрессии гена AGT, например, субъектов, предрасположенных к развитию нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии, или субъектов, у которых оно было диагностировано.

## **I. Определения**

Чтобы можно было легче понимать настоящее изобретение, вначале приводятся определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях изложения значения или диапазона значений параметра подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к изложенным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одной или нескольких (т. е. по меньшей мере одного) грамматических форм предмета заявки. В качестве примера "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

Термин "включая" используют в данном документе для обозначения фразы "включая без ограничения" и используют взаимозаменяемо с ней.

Термин "или" используют в данном документе для обозначения термина "и/или", если из контекста явно не следует иное, и используют взаимозаменяемо с ним. Например, под выражением "смысловая нить или антисмысловая нить" понимают выражение "смысловая нить или антисмысловая нить или смысловая нить и антисмысловая нить".

Термин "приблизительно" используют в данном документе для обозначения нахождения в пределах типичных диапазонов отклонений, допустимых в данной области техники. Например, "приблизительно" можно понимать как нахождение в пределах приблизительно 2 стандартных отклонений от среднего. В определенных вариантах осуществления приблизительно означает +10%. В определенных вариантах осуществления приблизительно означает +5%. В случае, когда "приблизительно" находится перед группой числовых значений или диапазоном, понятно, что "приблизительно" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Термин "по меньшей мере" перед числовым значением или группой числовых значений понимают как включающий числовое значение, находящееся рядом с термином "по меньшей мере", и все последующие числовые значения или целые числа, которые могут быть по логике включены, что ясно из контекста. Например, числовое значение нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно представлять собой целое число.

Например, "по меньшей мере 19 нуклеотидов из молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотида" означает, что указанным свойством обладают 19, 20 или 21 нуклеотидов. В случае, когда "по меньшей мере" находится перед группой числовых значений или диапазоном, понятно, что "по меньшей мере" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне.

Используемые в данном документе фразы "не более чем" или "менее чем" понимают как значение, находящее рядом с фразой, и логические более низкие значения или целые числа, которые логически следуют из контекста, вплоть до нуля. Например, дуплекс с выступающим концом, состоящим из "не более чем 2 нуклеотидов", имеет выступающий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. В случае, когда "не более чем" находится перед группой числовых значений или диапазоном, понятно, что "не более чем" может модифицировать каждое из числовых значений в группе или диапазоне. Используемые в данном документе диапазоны включают как верхний, так и нижний пределы.

В случае несоответствия между последовательностью и ее указанным сайтом в транскрипте или другой последовательностью, нуклеотидная последовательность, указанная в настоящем описании, имеет приоритет.

Используемый в данном документе "ангиотензиноген", используемый взаимозаменяемо с термином "AGT", относится к хорошо известным гену и полипептиду, также известным в данной области техники как представитель 8 клады А серпинов-ингибиторов пептидаз; альфа-1-антипротеиназа; антитрипсин; SERPINA8; ангиотензин I; серпин A8; ангиотензин II; альфа-1-антипротеиназный ангиотензиноген; антитрипсин; преангиотензиноген-2; ANHU; ингибитор сериновой протеиназы и ингибитор цистеиновой протеиназы.

Термин "AGT" включает AGT человека, аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, под номером доступа GenBank GI:188595658 (NM\_000029.3; SEQ ID NO:1); AGT *Macaca fascicularis*, аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, под номером доступа GenBank GI: 90075391 (AB170313.1: SEQ ID NO:3); AGT мыши (*Mus musculus*), аминокислотную и полную кодирующую последовательность которого можно найти, например, под номером доступа GI: 113461997 (NM\_007428.3; SEQ ID NO:5); и AGT крысы (*Rattus norvegicus*), аминокислотную и полную кодирующую последовательность этого AGT можно найти, например, под номером доступа GI:51036672 (NM\_134432; SEQ ID NO:7).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК AGT являются легкодоступными при использовании находящихся в публичном доступе баз данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Термин "AGT", используемый в данном документе, также относится к встречающимся в природе вариантам последовательности ДНК гена AGT, таким как однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене AGT. Иллюстративные SNP можно найти в базе данных dbSNP, доступной по ссылке

[www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?geneId=183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=183). Неограничивающие примеры вариантов последовательности в пределах гена AGT включают, например, варианты, описанные в патенте США № 5589584, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Например, варианты последовательности в пределах гена AGT могут включать такие как С→Т в положении -532 (относительно сайта начала транскрипции); G→A в положении -386; G→A в положении -218; С→Т в положении -18; G→A и А→С в положении -6 и -10; С→Т в положении +10 (нетранслируемом); С→Т в положении +521 (T174M); Т→С в положении +597 (P199P); Т→С в положении +704 (M235T; см. также, например, сводка кластеров с эталонными SNP (refSNP): rs699, доступна по ссылке [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)); А→G в положении +743 (Y248C); С→Т в положении +813 (N271N); G→A в положении +1017 (L339L); С→А в положении +1075 (L359M) и/или G→A в положении +1162 (V388M).

Используемый в данном документе термин "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в ходе транскрипции гена AGT, включая мРНК, которая представляет собой продукт РНК-процессинга первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в ходе транскрипции гена AGT, или рядом с ней. В одном варианте осуществления целевая последовательность находится в пределах белоккодирующего участка AGT.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 19-36 нуклеотидов, например, предпочтительно приблизительно 19-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять приблизительно 19-30 нуклеотидов, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь из нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, обозначает нуклеотид, который в качестве основания содержит гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил соответственно. Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или имитирующему заменяющему фрагменту (см., например, таблицу 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами практически без изменения свойств спаривания оснований у

олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дсРНК, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены на гуанин и урацил соответственно для образования неоднозначных пар оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

Термины "иРНК", "средство для РНКи", "средство на основе иРНК", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). иРНК управляет специфическим в отношении последовательности разрушением мРНК за счет процесса, который известен как РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например подавляет, экспрессию гена AGT в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению предусматривает однонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК AGT, управляет расщеплением целевой РНК. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, распадается на онРНК под действием эндонуклеазы III типа, известной под названием Dicer (*Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485*). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг дсРНК до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (*Bernstein, et al., (2001) Nature 409:363*). Затем онРНК встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), где одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс онРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием целевой последовательности (*Nykanen, et al., (2001) Cell 107:309*). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень с индукцией сайленсинга (*Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188*). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к однонитевой РНК (онРНК), образованной в пределах клетки и содействующей образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена AGT. Соответственно, термин "онРНК" также используется в данном документе для обозначения вышеописанной иРНК.

В определенных вариантах осуществления средство для РНКи может представлять собой однонитевую онРНК (онРНКи), которую вводят в клетку или организм для

подавления целевой мРНК. Однонитевые средства для РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Однонитевые онРНК, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Разработка и тестирование однонитевых онРНК описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно применять в виде однонитевой онРНК, описанной в данном документе, или в виде последовательности, химически модифицированной с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В определенных вариантах осуществления "иРНК" для применения в композициях, путях применения и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК и упоминается в данном документе как "средство на основе двухнитевой РНК", "молекула двухнитевой РНК (дсРНК)", "средство на основе дсРНК" или "дсРНК". Термин "дсРНК" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, содержащему две антипараллельные и практически полностью комплементарные нити нуклеиновой кислоты, обозначаемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т. е. гену AGT. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (дсРНК) запускает разрушение целевой РНК, например, мРНК, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, называемого в данном документе РНК-интерференцией или РНКи.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы дсРНК являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемая в настоящем описании "иРНК" может содержать рибонуклеотиды с химическими модификациями; иРНК может содержать значительные модификации нескольких нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь, или модифицированное нуклеиновое основание, или любую их комбинацию. Таким образом, термин "модифицированный нуклеотид" охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, применяемые в молекуле типа онРНК, охватываются терминами "иРНК" или "средство для РНКи" для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может быть любой длины, которая обеспечивает возможность осуществления специфического разрушения требуемой целевой РНК посредством пути с

участием RISC, и его длина может находиться в диапазоне от приблизительно 19 до 36 пар оснований, например, его длина может составлять приблизительно 19-30 пар оснований, например, приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как например, приблизительно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные относительно вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. В тех случаях, когда две нити являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительная цепь РНК называется петлей типа "шпилька". Петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля типа "шпилька" может содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или больше неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 10 нуклеотидов или меньше. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 8 или меньше неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлю типа "шпилька" могут составлять 4-8 нуклеотидов.

В тех случаях, когда две практически полностью комплементарные нити дсРНК образованы отдельными молекулами РНК, эти молекулы не должны, но могут быть соединены ковалентно. В тех случаях, когда две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительная структура обозначается как "линкер". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой нити дсРНК за вычетом любых выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для РНКи может содержать один или несколько нуклеотидных выступающих концов.

В определенных вариантах осуществления средство на основе иРНК по настоящему изобретению представляет собой дсРНК, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, гена AGT, при этом управляет расщеплением целевой РНК.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению представляет собой дсРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, целевой последовательностью мРНК AGT, при этом

управляет расщеплением целевой РНК.

Используемый в данном документе термин "нуклеотидный выступающий конец" относится к по меньшей мере одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры двухнитевой иРНК. Например, в случае, когда 3'-конец одной нити дсРНК выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот, образуется нуклеотидный выступающий конец. дсРНК может содержать выступающий конец из по меньшей мере одного нуклеотида; в качестве альтернативы выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или больше. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(-е) конец(концы) может(-гут) находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(-ы) выступающего конца может(-гут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах как антисмысловой, так и смысловой нити дсРНК.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить дсРНК содержит нуклеотидный выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов на 3'-конце или 5'-конце. В определенных вариантах осуществления выступающий конец на смысловой нити или антисмысловой нити, или обеих, может содержать удлиненные отрезки, длина которых составляет более 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец находится на антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления удлиненный выступающий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в удлиненном выступающем конце заменены на нуклеозидтиофосфат. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означает, что на конце средства на основе двухнитевой РНК нет неспаренных нуклеотидов, т. е. нуклеотидный выступающий конец отсутствует. Средство на основе двухнитевой РНК "с тупыми концами" является двухнитевым на протяжении всей своей длины, т. е. на каждом конце молекулы нуклеотидный выступающий конец отсутствует. Средства для РНКи по настоящему изобретению включают средства для РНКи без нуклеотидного выступающего конца на

одном конце (т. е. средства с одним выступающим концом и одним тупым концом) или без нуклеотидных выступающих концов на каждом конце. Чаще всего такая молекула будет двухнитевой на протяжении всей своей длины.

Термин "антисмысловая нить" или "направляющая нить" относится к нити иРНК, например дсРНК, которая содержит участок, который практически полностью комплементарен целевой последовательности, например мРНК АГТ. Используемый в данном документе термин "участок комплементарности" относится к участку антисмысловой нити, который практически полностью комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности АГТ, определенной в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, ошибки спаривания могут находиться во внутренних или концевых участках молекулы. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых участках, например, в пределах 5, 4 или 3 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца иРНК. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению содержит ошибку спаривания нуклеотидов в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления средство на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению содержит ошибку спаривания нуклеотидов в смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. В другом варианте осуществления ошибка спаривания нуклеотидов находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде иРНК.

Используемый в данном документе термин "смысловая нить" или "сопровождающая нить" относится к нити иРНК, которая содержит участок, который практически комплементарен участку антисмысловой нити, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе.

Используемая в данном документе фраза "практически все нуклеотиды являются модифицированными" означает, что большая часть нуклеотидов, но не все без исключения являются модифицированными, и может предусматриваться не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт в целевой последовательности, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания, которые находятся на любом из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, связываемым нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, а участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Если не указано иное, используемый в данном документе термин

"комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащих первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, что будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, при этом жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей отмыжкой (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как соответствующие физиологические условия, которые могут встречаться в организме. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах иРНК, например, в пределах дсРНК, описанной в данном документе, предусматривают спаривание оснований между олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими первую полинуклеотидную последовательность, и олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащими вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В данном документе такие последовательности могут обозначаться как "полностью комплементарные" по отношению друг к другу. Тем не менее, в тех случаях, когда в данном документе первая последовательность обозначается как "практически комплементарная" по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может происходить ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса размером не более 30 пар оснований, при этом сохраняется способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, подавлению экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако, в тех случаях, когда два олигонуклеотида разработаны так, чтобы после гибридизации образовался один или несколько односторонних выступающих концов, такие выступающие концы не будут считаться ошибками спаривания, принимая во внимание определение комплементарности. Например, дсРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом обозначаться как "полностью комплементарная" для целей, описанных в данном документе.

Используемые в данном документе "комплементарные" последовательности могут также содержать пары оснований, которые образованы не по модели Уотсона-Крика, и/или пары оснований, образованных из не встречающихся в природе и модифицированных

нуклеотидов, или могут быть полностью образованы из таких пар, при условии, что выполняются вышеуказанные требования по их способности к гибридизации. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначные G:U или Хугстиновские пары оснований.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "практически полностью комплементарный" в данном документе можно применять по отношению к соответствию оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью дсРНК или между антисмысловой нитью средства на основе двухнитевой РНК и целевой последовательностью, что будет понятно из контекста их применения.

**Используемый в данном документе полинуклеотид, который "практически полностью комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который практически полностью комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей ген AGT). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК AGT, если последовательность практически полностью комплементарна непрерывной части мРНК, кодирующей ген AGT.**

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе полинуклеотиды смысловых нитей и полинуклеотиды антисмысловых нитей полностью комплементарны целевой последовательности AGT. В других вариантах осуществления полинуклеотиды смысловой нити или антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически полностью комплементарны целевой последовательности AGT и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под любым из SEQ ID NO:1 и 2 или фрагменту любой из SEQ ID NO:1 и 2, например, комплементарна на по меньшей мере 90% или 95% или комплементарна на 100%.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности AGT. В других вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, практически полностью комплементарны целевой последовательности AGT и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:1 или фрагменту SEQ ID NO:1, например, комплементарна на приблизительно 90% или на приблизительно 95%. В определенных вариантах осуществления фрагмент SEQ ID NO: 1 выбран из группы нуклеотидов 632-658, 635-658, 636-658, 1248-1273, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303 или 2282-2304 из SEQ ID NO: 1. В предпочтительных вариантах осуществления дуплекс не состоит из смысловой нити, состоящей из

uscsuccAfcCfUfUfuucuucaauL96 (SEQ ID NO: 13), и антисмысловой нити, состоящей из asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu (SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению предусматривает антисмысловую нить, которая практически полностью комплементарна целевой последовательности AGT и содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из смысловых нитей в таблице 3, таблице 5 или таблице 6 или фрагменту любой из смысловых нитей в таблице 3, таблице 5 или таблице 6, например, комплементарна на приблизительно 90%, 95% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению предусматривает смысловую нить, которая практически полностью комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен целевой последовательности AGT, и где полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из антисмысловых нитей в таблице 3, 5 или 6 или фрагменту любой из антисмысловых нитей в таблице 3 или 5, например, на приблизительно 90%, 95% или 100%.

В определенных вариантах осуществления смысловая и антисмысловая нити в таблице 3 или таблице 5 выбраны из дуплексов AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637 и AD-85655.

Как правило, "иРНК" содержит рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, применяемые в молекуле онРНК, охватываются термином "РНКи" для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой молекулу одонитевого антисмыслового олигонуклеотида, которая подавляет целевую мРНК посредством механизма антисмыслового подавления. Молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида комплементарна последовательности в пределах целевой мРНК. Одонитевые антисмысловые олигонуклеотиды могут подавлять трансляцию стехиометрическом образом путем спаривания оснований с мРНК и физического препятствования механизму трансляции, см. Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Длина молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может составлять от

приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, и она имеет последовательность, которая комплементарна целевой последовательности. Например, молекула однонитевого антисмыслового олигонуклеотида может содержать последовательность, которая содержит по меньшей мере приблизительно 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

Фраза "приведение клетки в контакт с иРНК", такой как дсРНК, используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с иРНК включает приведение клетки в контакт с иРНК *in vitro* или приведение клетки в контакт с иРНК *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, РНКи может приводить в физический контакт с клеткой индивидуум, осуществляющий способ, или в качестве альтернативы иРНК можно поместить в обстановку, которая обеспечит возможность средству впоследствии прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно осуществлять, например, с помощью инкубирования клетки с иРНК. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно осуществлять, например, с помощью инъекции иРНК в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней, или с помощью инъекции иРНК в другую область, например, в кровоток или подкожное пространство таким образом, что средство впоследствии достигнет ткани, где находится клетка, которую необходимо привести в контакт. Например, иРНК может содержать или быть связана с лигандом, например, GalNAc, который направляет иРНК к представляющему интерес сайту, например, в печень. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку можно также приводить в контакт с иРНК *in vitro* и впоследствии пересаживать субъекту.

В определенных вариантах осуществления приведение клетки в контакт с иРНК включает "введение" или "доставку иРНК в клетку" за счет содействия поглощению или абсорбции в клетку или их осуществления. Абсорбция или поглощение иРНК могут происходить посредством самостоятельной диффузии или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение иРНК в клетку можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК можно вводить в сайт в ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже или известны из уровня техники.

Термин "липидная наночастица" или "LNP" означает везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, иРНК или плазида, с которой транскрибируется иРНК. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе "субъект" представляет собой животное, такое

как млекопитающее, в том числе примат (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), отличное от примата животное (такое как корова, свинья, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса или мышь) или птица, в которых целевой ген экспрессируется либо эндогенно, либо гетерологично. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека, такого как человек, подвергаемый лечению или оцениваемый в отношении заболевания или нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии AGT; человек, подверженный риску возникновения заболевания или нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии AGT; человек, имеющий заболевание или нарушение, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии AGT; или человек, подвергаемый лечению заболевания или нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии AGT, как описано в данном документе. Ниже представлены диагностические критерии нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком женского пола. В других вариантах осуществления субъект является человеком мужского пола. В определенных вариантах осуществления субъект является частью группы, предрасположенной к развитию солечувствительности, например человеком негроидной расы или пожилым человеком (возрастом > 65 лет). В определенных вариантах осуществления субъект страдает избыточным весом или ожирением, например, является субъектом, который страдает центральным ожирением. В определенных вариантах осуществления субъект ведет малоподвижный образ жизни. В определенных вариантах осуществления субъект является беременной женщиной.

Используемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к благоприятному или требуемому результату, такому как снижение проявления по меньшей мере одного признака или симптома нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии, у субъекта. Лечение также включает снижение проявления одного или нескольких признаков или симптомов, ассоциированных с нежелательной экспрессией AGT, например, активации рецептора 1-го типа ангиотензина II (AT<sub>1</sub>R) (например, гипертензии, хронического заболевания почек, инсульта, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, аневризм, заболевания периферических артерий, сердечного заболевания, повышенного окислительного стресса, например, повышенного образования супероксидов, воспаления, вазоконстрикции, удержания натрия и воды, потери калия и магния, подавления выработки ренина, гипертрофии миоцитов и гладких мышц, повышенного синтеза коллагена, стимуляции развития фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличения частоты и силы сердечных сокращений, изменения частоты сердечных сокращений, например, усиления аритмии, стимуляции ингибитора 1 активатора плазминогена (РАИ1), активации симпатической нервной системы и увеличения секреции эндотелина), симптомов гипертензии, ассоциированной с беременностью (например, преэклампсии и эклампсии), в том числе и без ограничений задержки внутриутробного

развития (IUGR) или задержки развития плода, симптомов, ассоциированных со злокачественной гипертензией, симптомов, ассоциированных с гиперальдостеронизмом; уменьшение степени нежелательной активации AT<sub>1</sub>R; стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния хронической активации AT<sub>1</sub>R; облегчение или смягчение нежелательной активации AT<sub>1</sub>R (например, гипертензии, хронического заболевания почек, инсульта, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, аневризм, заболевания периферических артерий, сердечного заболевания, повышенного окислительного стресса, например, повышенного образования супероксидов, воспаления, вазоконстрикции, удержания воды и натрия, потери калия и магния, подавления выработки ренина, гипертрофии миоцитов и гладких мышц, повышенного синтеза коллагена, стимуляции развития фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличения частоты и силы сердечных сокращений, изменения частоты сердечных сокращений, например, усиления аритмии, стимуляции ингибитора 1 активатора плазминогена (РАИ1), активации симпатической нервной системы и увеличения секреции эндотелина), независимо от того, являются ли они выявляемыми или невыявляемыми. Нарушения, ассоциированные с AGT, также могут включать ожирение, стеатоз печени/жировую печень, например, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), непереносимость глюкозы, диабет 2-го типа (инсулиннезависимый диабет) и метаболический синдром. В определенных вариантах осуществления гипертензия включает гипертензию, ассоциированную с низкой активностью ренина в плазме крови или низкой концентрацией ренина в плазме крови. "Лечение" также может означать увеличение срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни в отсутствие лечения.

В контексте уровня экспрессии гена AGT или выработки белка agt у субъекта или маркера заболевания или симптома термин "более низкий" относится к статистически значимому снижению такого уровня. Например, снижение может составлять по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня выявления для способа выявления в соответствующей клетке или ткани, например в клетке печени, или другого образца от субъекта, например, в крови или сыворотке крови, полученных от него, моче.

Используемые в данном документе "предупреждение" или "осуществление предупреждения" при применении в отношении заболевания или нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена AGT или продуцирования белка agt, например, у субъекта, предрасположенного к развитию нарушения, ассоциированного с AGT, что обусловлено, например, старением, генетическими факторами, гормональными изменениями, рационом и малоподвижным образом жизни. В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение представляют собой, например, симптом нежелательной активации AT<sub>1</sub>R, такой как гипертензия, хроническое заболевание почек, инсульт, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, аневризмы, заболевание периферических артерий, сердечное заболевание, повышенный окислительный стресс, например, повышенное образование

супероксидов, воспаление, вазоконстрикция, удержание воды и натрия, потеря калия и магния, подавление выработки ренина, гипертрофия миоцитов и гладких мышц, повышенный синтез коллагена, стимуляция развития фиброза сосудов, миокарда и почек, увеличение частоты и силы сердечных сокращений, изменение частоты сердечных сокращений, например, усиление аритмии, стимуляция ингибитора 1 активатора плазминогена (РА11), активация симпатической нервной системы и увеличение секреции эндотелина. Нарушения, ассоциированные с АГТ, также могут включать ожирение, стеатоз печени/жировую печень, например, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), непереносимость глюкозы, диабет 2-го типа (инсулиннезависимый диабет) и метаболический синдром. В определенных вариантах осуществления гипертензия включает гипертензию, ассоциированную с низкой активностью ренина в плазме крови или низкой концентрацией ренина в плазме крови. Например, вероятность развития гипертензии снижается, например, в случае, когда у индивидуума, имеющего один или несколько факторов риска возникновения гипертензии, не развивается гипертензия, либо развивается гипертензия меньшей степени тяжести в сравнении с группой индивидуумов, имеющих те же факторы риска и не получающих лечение, описанное в данном документе. Эффективным предупреждением считают отсутствие развития нарушения, ассоциированного с АГТ, например, гипертензии, или задержку развития гипертензии на месяцы или годы. Для предупреждения может потребоваться введение более чем одной дозы средства на основе иРНК.

Используемый в данном документе термин "заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном" или "заболевание, ассоциированное с АГТ" означает заболевание или нарушение, которые вызваны или ассоциированы с активацией ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (RAAS), или заболевание или нарушение, симптомы которых или прогрессирование которых дают ответ на инактивацию RAAS. Термин "заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном" включает заболевание, нарушение или состояние, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена АГТ. Такие заболевания обычно ассоциированы с высоким кровяным давлением. Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с ангиотензиногеном, включают гипертензию, например, пограничную гипертензию (также известную как прегипертензия), первичную гипертензию (также известную как эссенциальная гипертензия или идиопатическая гипертензия), вторичную гипертензию (также известную как неэссенциальная гипертензия), изолированную систолическую или диастолическую гипертензию, гипертензию, ассоциированную с беременностью (например, преэклампсию, эклампсию и послеродовую преэклампсию), диабетическую гипертензию, резистентную гипертензию, рефрактерную гипертензию, пароксизмальную гипертензию, реноваскулярную гипертензию (также известную как почечная гипертензия), гипертензию Гольдблатта, глазную гипертензию, глаукому, легочную гипертензию, портальную гипертензию, системную венозную гипертензию, систолическую гипертензию, лабильную гипертензию; гипертензивную болезнь сердца, гипертензивную нефропатию, атеросклероз,

артериосклероз, васкулопатию (в том числе заболевание периферических сосудов), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, хроническую сердечную недостаточность, кардиомиопатию, диабетическую сердечную миопатию, гломерулосклероз, коарктацию аорты, аневризму аорты, фиброз желудочка, апноэ во сне, сердечную недостаточность (например, систолическую дисфункцию левого желудочка), инфаркт миокарда, стенокардию, инсульт, заболевание почек, например хроническое заболевание почек или диабетическую нефропатию необязательно в контексте беременности, почечную недостаточность, например хроническую почечную недостаточность, и системный склероз (например, склеродермальный почечный криз). В определенных вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с AGT, включает задержку внутриутробного развития (IUGR) или задержку развития плода. В определенных вариантах осуществления нарушения, ассоциированные с AGT, также включают ожирение, стеатоз печени/жировую печень, например, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), непереносимость глюкозы, диабет 2-го типа (инсулиннезависимый диабет) и метаболический синдром. В определенных вариантах осуществления гипертензия включает гипертензию, ассоциированную с низкой активностью ренина в плазме крови или низкой концентрацией ренина в плазме крови.

Ниже подробно обсуждаются пороговые значения высокого кровяного давления и стадии гипертензии.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой первичную гипертензию. "Первичная гипертензия" развивается в результате воздействия среды или генетических причин (например, развивается в отсутствие очевидной медицинской первопричины).

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой вторичную гипертензию. "Вторичная гипертензия" характеризуется выявляемым нарушением, являющимся первопричиной, которое может иметь множественную этиологию, включая почечную, сосудистую и эндокринную причины, например, паренхиматозное заболевание почек (например, поликистоз почек, гломерулярное заболевание или коллагеноз), заболевание сосудов почек (например, стеноз почечной артерии, фиброзно-мышечная дисплазия), эндокринные нарушения (например, избыток адренокортикостероидов или минералокортикоидов, феохромоцитому, гипертиреоз или гипотиреоз, избыток гормона роста, гиперпаратиреоз), коарктацию аорты или применение пероральных контрацептивов.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой гипертензию, ассоциированную с беременностью, например, хроническую гипертензию при беременности, гипертензию беременных, преэклампсию, эклампсию, преэклампсию на фоне хронической гипертензии, HELLP-синдром и гипертензию беременных (также известную как транзиторная гипертензия во время беременности, хроническая гипертензия, выявленная во второй половине беременности, и индуцированная беременностью гипертензия (PIH)). Ниже представлены

диагностические критерии гипертензии, ассоциированной с беременностью.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с ангиотензиногеном, представляет собой резистентную гипертензию. "Резистентная гипертензия" означает кровяное давление, которое остается выше заданного показателя (например, систолическое выше 130 мм рт. ст. или диастолическое выше 90), несмотря на одновременный прием трех гипотензивных средств разных классов, одно из которых представляет собой тиазидный диуретик. Также считается, что резистентную гипертензию имеют субъекты, кровяное давление которых контролируется четырьмя или более лекарственными препаратами.

"Терапевтически-эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для РНКи, которое вызывает некоторый требуемый эффект при приемлемом соотношении польза/риск, предусмотренном для любого лечения. ИРНК, используемую в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для получения приемлемого соотношения польза/риск, предусмотренного для такого лечения.

Фраза "фармацевтически приемлемый" применяется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных, не вызывая чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель, добавку для производства (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке указанного соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не наносить вред субъекту, подлежащему лечению. Такие носители известны из уровня техники. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения с помощью инъекции.

Используемый в данном документе термин "образец" включает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы ткани могут включать образцы из тканей, органов или ограниченных участков. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток этих органов. В определенных вариантах осуществления образцы

могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта", относится к моче, полученной от субъекта. "Образец, полученный от субъекта" может относиться к крови или сыворотке крови или плазме крови, полученной из крови субъекта.

### **I. иРНК по настоящему изобретению**

В настоящем изобретении предусмотрены иРНК, которые подавляют экспрессию гена AGT. В предпочтительных вариантах осуществления иРНК включает молекулы двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) для подавления экспрессии гена AGT в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, предрасположенный к развитию нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии. Средство для днРНК включает антисмысловую нить с участком комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии гена AGT. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 19-30 нуклеотидов (например, длина составляет приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 или 19 нуклеотидов). **После контакта с клеткой, экспрессирующей ген AGT, иРНК подавляет экспрессию гена AGT (например, гена AGT человека, примата, отличного от примата животного или крысы) на по меньшей мере приблизительно 50%**, что установлено с помощью анализа, например, ПЦР или способа с использованием разветвленной ДНК (рДНК), или с помощью способа на основе анализа белков, как например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В предпочтительных вариантах осуществления подавление экспрессии определяют с помощью способа qPCR, представленного в примерах, в частности в примере 2, с использованием онРНК при концентрации 10 нМ на линии клеток подходящего организма, предусмотренной в нем. В предпочтительных вариантах осуществления подавление экспрессии *in vivo* определяют по нокдауну гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, у мыши или инфицированной с помощью AAV мыши, экспрессирующей целевой ген человека, например, при введении однократной дозы 3 мг/кг в момент максимального снижения экспрессии РНК. Экспрессию РНК в печени определяют с применением способов на основе ПЦР, представленных в примере 2.

дсРНК содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых дсРНК будет применяться. Одна нить дсРНК (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который **практически полностью комплементарен и, как правило, полностью комплементарен** целевой последовательности. **Целевую последовательность можно** получить из последовательности мРНК, образующейся в процессе экспрессии гена AGT. Другая нить (смысловая нить) содержит участок, который комплементарен антисмысловой нити, за счет этого две нити гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. **Как описано в другом месте в**

**данном документе и как известно из уровня техники, комплементарные последовательности дсРНК также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.**

Как правило, длина дуплексной структуры составляет от 19 до 30 пар оснований. Подобным образом, длина участка комплементарности для **целевой последовательности** составляет от 19 до 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина дсРНК составляет от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов, или длина составляет от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Как правило, дсРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно из уровня техники, дсРНК, длина которых составляет более чем приблизительно 21-23 нуклеотида, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Специалисту в данной области также будет понятно, что участок РНК, являющийся целевым для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, зачастую молекулы мРНК. В соответствующих случаях "часть" целевой мРНК представляет собой непрерывную последовательность целевой мРНК, имеющая достаточную длину, которая позволяет ей быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути с участием RISC).

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть дсРНК, например, дуплексный участок, содержащий от приблизительно 19 до приблизительно 30 пар оснований, например, приблизительно 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой дсРНК в тех случаях, когда она процессируется до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который нацеливается на требуемую РНК для расщепления. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления тиРНК представляет собой дсРНК. В другом варианте осуществления дсРНК представляет собой не встречающуюся в природе тиРНК. В другом варианте осуществления средство на основе иРНК, применимое для нацеливания на экспрессию гена AGT, не образуется в целевой клетке посредством расщепления более крупной дсРНК.

Описанная в данном документе дсРНК может дополнительно содержать один или несколько односторонних нуклеотидных выступающих концов, например, из 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. дсРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут характеризоваться более превосходными свойствами подавления по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступающий конец может содержать аналог нуклеотида/нуклеозида, включая

дезоксинуклеотид/нуклеозид, или состоять из него. Выступающий(-е) конец(концы) может(-гут) находиться на смысловой нити, антисмысловой нити или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(-ы) выступающего конца может(-гут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой или смысловой нити дсРНК.

ДсРНК можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных из уровня техники. Двухнитевые соединения для РНКи по настоящему изобретению можно получать с применением двухстадийной процедуры. Вначале отдельные нити молекулы двухнитевой РНК получают по отдельности. Затем составляющие нити отжигаются. Отдельные нити соединения на основе онРНК можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих. Преимущество органического синтеза заключается в том, что можно легко получать олигонуклеотидные нити, содержащие не встречающиеся в природе или модифицированные нуклеотиды. Подобным образом, одонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих.

В одном аспекте дсРНК по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Смысловая нить выбрана из группы последовательностей, представленных в **таблицах 3, 5 и 6**, а соответствующая смысловой нити антисмысловая нить выбрана из группы последовательностей из **таблицы 3, 5 и 6**. В данном аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей **практически** полностью комплементарна последовательности мРНК, образующейся при экспрессии гена AGT. В связи с этим, в этом аспекте дсРНК будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить в **таблице 5 или 6**, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить в **таблице 3, 5 или 6**. **В определенных вариантах осуществления практически полностью комплементарные последовательности дсРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. В других вариантах осуществления практически полностью комплементарные последовательности дсРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.** В определенных вариантах осуществления смысловая или антисмысловая нить из таблицы 3 или 5 выбрана из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637 и AD-85655.

Будет понятно, что, хотя последовательности в **таблице 3** не описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, дсРНК по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, представленных в **таблице 3, или последовательностей**

**из таблицы 5 или 6, которые являются модифицированными, или последовательностей из таблицы 5 или 6, которые являются конъюгированными.** Другими словами, настоящее изобретение охватывает дсРНК из **таблицы 3, 5 и 6**, которые являются немодифицированными, неконъюгированными, модифицированными или конъюгированными, как описано в данном документе.

Специалисту в данной области хорошо известно, что дсРНК, имеющие дуплексную структуру из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были признаны особенно эффективными для индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Тем не менее, другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, представленных в **какой-либо из таблиц 3, 5 и 6**, дсРНК, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить, длина которой составляет как минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей из **таблицы 3, 5 и 6**, за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть эффективными, аналогично описанным выше дсРНК. Следовательно, предусмотрено, что дсРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 19, 20 или больше смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей из **таблицы 3, 5 и 6**, и отличающиеся своей способностью подавлять экспрессию гена AGT не более чем на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от подавления, осуществляемого дсРНК, содержащей полную последовательность, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, представленные в **таблице 3, 5 и 6**, идентифицируют сайт(-ы) в транскрипте AGT, который(-ые) поддается(-ются) RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены иРНК, которые нацелены на один из этих сайтов. Как используется в данном документе, говорится, что иРНК нацелена на конкретный сайт РНК-транскрипта, если иРНК содействует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах данного конкретного сайта. Такая иРНК будет, как правило, содержать по меньшей мере приблизительно 19 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в **таблице 3, 5 и 6**, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене AGT.

## **II. Модифицированные иРНК по настоящему изобретению**

В определенных вариантах осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, дсРНК, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации или конъюгации, известные из уровня техники и описанные в данном документе. В других вариантах осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, дсРНК, является химически модифицированной с целью

повышения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения практически все нуклеотиды иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды иРНК или практически все нуклеотиды иРНК являются модифицированными, т. е. в нити иРНК присутствует не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы или модифицированы способами, хорошо известными из уровня техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т. д.); модификации оснований, например, замену на стабилизирующие основания, дестабилизирующие основания или основания, которые образуют пару оснований с расширенным спектром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгацию оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Специфические примеры соединений на основе иРНК, применимых в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК, имеющие модифицированные остовы включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в уровне техники модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, сложные фосфотриэфиры, сложные аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, сложные тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их аналоги с 2'-5'-связями, а также молекулы с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных структурных единиц соединены в направлении от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3,687,808;

4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,195; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,316; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,625,050; 6,028,188; 6,124,445; 6,160,109; 6,169,170; 6,172,209; 6, 239,265; 6,277,603; 6,326,199; 6,346,614; 6,444,423; 6,531,590; 6,534,639; 6,608,035; 6,683,167; 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, представляют собой остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы, имеющие морфолиновые связи (частично образованные на основе сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленаформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей с N, O, S и CH<sub>2</sub>.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,64,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; и 5,677,439,, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Подходящие РНК-миметики рассматриваются для применения в иРНК, предусмотренных в данном документе, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов из нуклеотидных структурных единиц, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохранены для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислотой. Одно такое олигомерное соединение, в котором РНК-миметик, который, как было показано, обладает превосходными параметрами гибридизации, обозначается как пептидная нуклеиновая кислота (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен на амидсодержащий остов, в частности аминоэтилглициновый остов. Нуклеиновые основания оставлены, и они связаны непосредственно или опосредованно с атомами азота азагруппы амидной части остова. Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США №№ 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством

ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в иРНК по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности,  $--CH_2--NH--CH_2-$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2-$  [известный как метилен(метилямино) или ММІ-остов],  $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2-$ ,  $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-$  и  $--N(CH_3)--CH_2--CH_2-$  [где нативный остов, образованный сложной фосфодизфирной связью, представлен как  $--O--P--O--CH_2-$ ] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова из вышеупомянутого патента США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. иРНК, например, дсРНК, представленные в данном документе, могут содержать в 2'-положении одно из следующего: ОН; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкил или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>алкенил и алкинил. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления дсРНК содержат в 2'-положении одно из следующего: низший C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств иРНК или группу для улучшения фармакодинамических свойств иРНК и другие заместители с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группа O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-аминопропокси (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК из числа иРНК, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в дсРНК с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные

фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США №№ 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; и 5,700,920, некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

иРНК также может содержать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто "основанием"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включают пуриновые основания, аденин (A) и гуанин (G), и пиримидиновые основания, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоген-урацил и цитозин, 5-пропинил-урацил и цитозин, 6-азо-урацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают такие как те, что раскрыты в патенте США № 3687808, такие как те, что раскрыты в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; такие как те, что раскрыты в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, такие как те, что раскрыты в *Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и такие как те, что раскрыты в *Sanghvi, Y S., Chapter 15, дсРНК Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (*Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., дсРНК Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278*), и они являются иллюстративными замещениями оснований, при этом еще в большей степени они действуют в сочетании с 2'-О-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение некоторых из

вышеуказанных модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают без ограничения вышеуказанные патенты США №№ 3,687,808, 4,845,205; 5,130,30; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 6,015,886; 6,147,200; 6,166,197; 6,222,025; 6,235,887; 6,380,368; 6,528,640; 6,639,062; 6,617,438; 7,045,610; 7,427,672; и 7,495,088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

РНК из числа иРНК также может быть модифицирована таким образом, что включает одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в онРНК повышает стабильность онРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

В некоторых вариантах осуществления РНК из числа иРНК также может быть модифицирована таким образом, что включает один или несколько бициклических сахарных фрагментов. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное путем формирования мостика между двумя атомами. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид, имеющий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, вследствие чего образуется бициклическая кольцевая система. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-атом углерода и 2'-атом углерода в сахарном кольце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по настоящему изобретению может содержать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в онРНК повышает стабильность онРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмысловых полинуклеотидов по настоящему изобретению содержат один или несколько

бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4'-2' включают без ограничения 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также называемый "конформационно затрудненным этилом" или "сEt") и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134) и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых изложено получение нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие: патенты США №№ 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов можно получать с одной или несколькими стереохимическими конфигурациями сахаров, в том числе, например, α-L-рибофуранозой и β-D-рибофуранозой (см. WO 99/14226).

РНК из числа иРНК также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или несколько затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в данном документе "затрудненный этилом нуклеотид" или "сEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, обозначаемой в данном документе как "S-сEt".

иРНК по настоящему изобретению может также содержать один или несколько "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2'- и C4'-атомы углерода рибозы или C3'- и C5'-атомы углерода рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильную конформацию и повышает аффинность гибридизации с мРНК. Длина линкера является достаточной, чтобы поместить атом кислорода в положение, оптимальное для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему "сморщиванию" рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, в которых изложено получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают без ограничения публикацию патента США № 2013/0190383 и публикацию согласно PCT WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению содержит

один или несколько мономеров, которые представляют собой нуклеотиды типа UNA (незапертая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незапертую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой какая-либо из связей в сахарном фрагменте была удалена с образованием незапертого "сахарного" остатка. В одном примере UNA также охватывает мономер, у которого были удалены связи C1'-C4' (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере связь C2'-C3' (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') в сахарном фрагменте была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и *Fluiter et al., Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, настоящим включенные посредством ссылки).

Репрезентативные публикации США, в которых изложено получение UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциальные стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННас), N-капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННас), тимидин-2'-0-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации согласно РСТ № WO 2011/005861.

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

#### *А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы по настоящему изобретению*

В определенных аспектах настоящего изобретения средства на основе двухнитевой РНК по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO2013/075035, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В WO2013/075035 предусмотрены мотивы из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловой нити или антисмысловой нити средства для днРНКи, в частности в сайте расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для днРНКи могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение этих мотивов нарушает паттерн модификаций смысловой и/или антисмысловой нити, если он имеется. Средство для днРНКи может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNас, например, в смысловой нити.

Более конкретно, в случае, когда смысловая нить и антисмысловая нить средства на основе двухнитевой РНК полностью модифицированы таким образом, что имеют один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных

нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним по меньшей мере одной нити средства для днРНКи, наблюдали активность средства для днРНКи в отношении сайленсинга генов.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены средства на основе двухнитевой РНК, способные к подавлению экспрессии целевого гена (т. е. гена AGT) *in vivo*. Средство для РНКи содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для РНКи может составлять 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21 нуклеотида, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс ("дсРНК"), также называемый в данном документе как "средство для днРНКи". Дуплексный участок средства для днРНКи может быть, например, дуплексным участком, длина которого составляет 27-30 пар нуклеотидов, 19-25 пар нуклеотидов, 19-23 пары нуклеотидов, 19-21 пару нуклеотидов, 21-25 пар нуклеотидов или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере длина дуплексного участка выбрана из 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления средство для днРНКи может содержать один или несколько участков выступающих концов или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может независимо составлять 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5 нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления участки выступающих концов могут содержать удлиненные участки выступающих концов, предусмотренные выше. Наличие выступающих концов может быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или может быть результатом того, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибку спаривания с целевой мРНК, или он может быть комплементарен геномным последовательностям, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием "шпильки" или с помощью других линкеров, не содержащих оснований.

В определенных вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в участке выступающего конца средства для днРНКи независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая без ограничения с 2'-модифицированным сахаром, такой как 2-F-, 2'-О-метилтимидин (Т), 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и любые их комбинации. Например, последовательность выступающего конца на каждом конце каждой нити может представлять собой ТТ. Выступающий конец может образовывать ошибку спаривания с целевой мРНК, или он может быть комплементарен геномным последовательностям, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступающие концы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих

нитей средства для днРНКи могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления участок(участки) выступающего конца содержит(-ат) два нуклеотида, имеющих фосфотиоатную связь между этими двумя нуклеотидами, при этом эти два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления этот 3'-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

Средство для днРНКи может содержать только один выступающий конец, который может усиливать интерферирующую активность РНКи без воздействия на его общую стабильность. Например, односторонний выступающий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой нити. Средство для РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или наоборот. Как правило, антисмысловая нить средства для днРНКи имеет нуклеотидный выступающий конец на 3'-конце, и при этом 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, предполагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и выступающий конец на 3'-конце антисмысловой нити благоприятствует включению направляющей нити в процесс RISC.

В определенных вариантах осуществления средство для днРНКи представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 19 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В других вариантах осуществления средство для днРНКи представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 20 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще нескольких других вариантах осуществления средство для днРНКи представляет собой олигонуклеотид с обоими тупыми концами, длина которого составляет 21 нуклеотид, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В определенных вариантах осуществления средство для днРНКи содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех

последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для РНКи является тупым, в то время как другой конец содержит выступающий конец из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити.

В случае, когда выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между тремя концевыми нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из этих трех нуклеотидов являются нуклеотидами выступающего конца, а третий нуклеотид представляет собой образующий пару нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. В одном варианте осуществления средство для РНКи дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для днРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления каждый остаток является независимо модифицированным с помощью 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в виде чередующегося мотива. Необязательно средство для днРНКи дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc<sub>3</sub>).

В определенных вариантах осуществления средство для днРНКи содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, где, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой нити содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой нити является неспаренным со смысловой нитью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов являются неспаренными со смысловой нитью, вследствие чего образуется 3'-однонитевой выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой нити содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые являются неспаренными со смысловой нитью, вследствие чего образуется 5'-однонитевой выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой нити являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой нити, когда смысловая и антисмысловая нити выровнены для максимальной комплементарности, вследствие чего образуется практически полностью дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить в достаточной степени комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой нити, чтобы снизить экспрессию целевого гена при введении двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где

смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В определенных вариантах осуществления средство для днРНКи содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для днРНКи содержит первую нить, длина которой составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую нить, длина которой составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, и вторая нить на своем 3'-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая нить, где длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, чтобы снижать экспрессию целевого гена, где средство для РНКи вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для днРНКи с помощью Dicer предпочтительно приводит к образованию онРНК, содержащей 3'-конец второй нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно, средство для днРНКи дополнительно содержит лиганд.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить средства для днРНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить средства для днРНКи может также содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в антисмысловой нити или рядом с ним.

В случае средства для днРНКи, имеющего дуплексный участок, длина которого составляет 19-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой нити обычно находится около положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка средства для днРНКи от 5'-конца.

Смысловая нить средства для днРНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления нити; и антисмысловая нить может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте

расщепления нити или рядом с ним. В случае, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дсРНК-дуплекс, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити перекрываются на по меньшей мере один нуклеотид, т. е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований с по меньшей мере одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы могут перекрываться по меньшей мере два нуклеотида или могут перекрываться все три нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить средства для днРНКи может содержать более чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе относится к мотиву, находящемуся в другой части нити, которая отделена от мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним на той же нити. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена от него по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В случае, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, химические структуры мотивов отличаются друг от друга, а в случае, когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, их химическая структура может быть одинаковой или разной. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, в случае, когда присутствуют две фланкирующие модификации, каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, находящегося в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон от основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для днРНКи может содержать более чем один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Эта антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций, которые при выравнивании имеют расположение, подобное фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для днРНКи обычно не включает один или два первых концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В других вариантах осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для днРНКи обычно не включает один или два первых спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В случае, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для днРНКи содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие

модификации могут приходиться на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В случае, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для днРНКи содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены таким образом, что две модификации, каждая от одной нити, приходятся на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, приходятся на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обеим сторонам от основного мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для днРНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицированным. Каждый нуклеотид может быть модифицирован с помощью одинаковой или разной модификации, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих не образующих связь атомов кислорода в фосфате или одного или нескольких образующих связь атомов кислорода в фосфате; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфорилированными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера модификация может встречаться только в 3'-или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухнитевом участке, в одонитевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в одонитевом участке РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении не образующего связь атома О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухнитевом и одонитевом участках, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Например, это создает возможность для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов в одонитевые выступающие концы, например в 5'- или 3'-выступающий конец или в оба. Например, может потребоваться включить

пуриновые нуклеотиды в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными из уровня техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, нуклеинового основания с 2'-дезокси-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-О-метил-модифицированным сахаром вместо рибозного сахара, а также модификации в фосфатной группе, например, фосфотиоатные модификации. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными с целевой последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезокси, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

Как правило, в смысловой нити и антисмысловой нити присутствуют по меньшей мере две различные модификации. Эти две модификации могут представлять собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации или другие.

В определенных вариантах осуществления  $N_a$  или  $N_b$  содержат модификации в виде чередующегося паттерна. Используемый в данном документе термин "чередующийся мотив" обозначает мотив, имеющий одну или несколько модификаций, при этом каждая модификация встречается в чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации в нуклеотиде, то чередующийся паттерн, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных вариантов модификаций в пределах чередующегося мотива, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т. д.

В некоторых вариантах осуществления у средства для днРНК по настоящему изобретению паттерн модификаций в виде чередующегося мотива в смысловой нити сдвинут относительно паттерна модификации в виде чередующегося мотива в антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует группе нуклеотидов антисмысловой нити, модифицированной другим способом, и наоборот. Например, при спаривании смысловой

нити с антисмысловой нитью в дсРНК-дуплексе чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "АВАВАВ" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВАВАВА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'- к 3'-концу нити, и чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью существует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В некоторых вариантах осуществления средства для днРНКи изначально имеет сдвиг паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой нити относительно паттерна чередующегося мотива из 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой нити, т. е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в смысловой нити образует пару оснований с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой нити и наоборот. Положение 1 в смысловой нити может начинаться с 2'-F-модификации, а положение 1 в антисмысловой нити может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает исходный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити или антисмысловой нити. Это нарушение паттерна модификаций смысловой или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую или антисмысловую нить может повышать активность сайленсинга генов против целевого гена.

В некоторых вариантах осуществления в случае, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, представляет собой модификацию, отличную от модификации мотива. Например, часть содержащей мотив последовательности представляет собой "...N<sub>a</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>N<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию в виде мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>", которая отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или разными модификациями. В качестве альтернативы N<sub>a</sub> или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать в том случае, если присутствует фланкирующая модификация.

РНКи может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может встречаться в любом нуклеотиде смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться в каждом нуклеотиде в смысловой нити или антисмысловой нити; при этом каждая модификация

межнуклеотидной связи может встречаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для РНКи содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления средство для днРНКи содержит фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, участок выступающего конца может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для присоединения нуклеотидов выступающего конца к концевым спаренным нуклеотидам в пределах дуплексного участка. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды выступающего конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид выступающего конца со спаренным нуклеотидом, который является следующим за нуклеотидом выступающего конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами может присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, а третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. Эти три концевые нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити или 5'-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления выступающий конец из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, а третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступающего конца. Необязательно, средство для днРНКи может дополнительно содержать две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для днРНКи содержит ошибку(-и)

спаривания с целевой последовательностью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибка спаривания может встречаться в участке выступающего конца или в дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар на основе индивидуальных пар, однако также можно использовать анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Ошибки спаривания, например, неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других частях данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

В определенных вариантах осуществления у средства для днРНКи по меньшей мере одна из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований от 5'-конца в пределах дуплексных участков антисмысловой нити независимо выбрана из группы, состоящей из A:U, G:U, I:C и пар с ошибками спаривания, например, неканонических, или отличных от канонических типов спаривания, или типов спаривания, которые включают универсальное основание, чтобы содействовать диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

В определенных вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 от 5'-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити выбран из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований от 5'-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований от 5'-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити представляет собой пару оснований AU.

В других вариантах осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой нити представляет собой дезокситимин (dT), или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). Например, на 3'-конце смысловой, антисмысловой нити или обеих нитей присутствует короткая последовательность из дезокситиминовых нуклеотидов, например, двух нуклеотидов dT.

В определенных вариантах осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I),



где:

каждый из  $i$  и  $j$  независимо составляет 0 или 1;

каждый из  $p$  и  $q$  независимо составляет 0-6;

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

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

каждый из  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца; где  $N_b$  и  $Y$  имеют разную модификацию; и

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

В некоторых вариантах осуществления  $N_a$  или  $N_b$  содержат модификации в виде чередующегося паттерна.

В некоторых вариантах осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, в случае, когда средство для днРНКи содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив YYY может находиться в сайте расщепления или вблизи него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка.

В одном варианте осуществления  $i$  составляет 1, а  $j$  составляет 0, или  $i$  составляет 0, а  $j$  составляет 1, или как  $i$ , так и  $j$  составляют 1. Таким образом, смысловая нить может быть представлена следующими формулами:

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

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

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

В случае, когда смысловая нить представлена формулой (Ib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

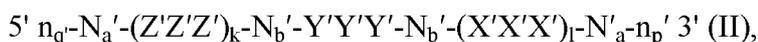
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

В других вариантах осуществления  $i$  составляет 0, а  $j$  составляет 0, и смысловая нить может быть представлена формулой:



В случае, когда смысловая нить представлена формулой (Ia), каждый  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити средства для РНКи может быть представлена формулой (II),



где:

каждый из  $k$  и  $l$  независимо составляет 0 или 1;

каждый из  $p'$  и  $q'$  независимо составляет 0-6;

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

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

каждый из  $n_p'$  и  $n_q'$  независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца;

где  $N_b'$  и  $Y'$  имеют разную модификацию; и

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

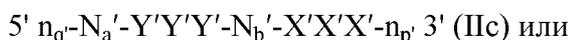
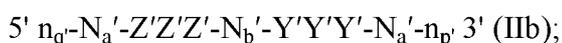
В некоторых вариантах осуществления  $N_a'$  или  $N_b'$  содержат модификации в виде чередующегося паттерна.

Мотив  $Y'Y'Y'$  встречается в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, в случае, когда средство для днРНКи имеет дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив  $Y'Y'Y'$  может встречаться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка. Предпочтительно, мотив  $Y'Y'Y'$  находится в положениях 11, 12, 13.

В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды мотива  $Y'Y'Y'$  представляют собой 2'-ОМе-модифицированные нуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления  $k$  составляет 1, а  $l$  составляет 0, или  $k$  составляет 0, а  $l$  составляет 1, или как  $k$ , так и  $l$  составляют 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:



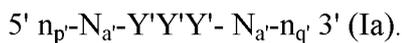
В случае, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-

2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

В случае, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIд), каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно,  $N_b$  составляет 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления  $k$  составляет 0, и  $l$  составляет 0, и антисмысловая нить может быть представлена формулой:



В случае, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIa), каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$  может быть одинаковым или отличным от остальных.

Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити может быть независимо модифицирован с помощью LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора. Каждый  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $X'$ ,  $Y'$  и  $Z'$ , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить средства для днРНКи может содержать мотив  $YYY$ , встречающийся в положениях 9, 10 и 11 нити, в случае, когда дуплексный участок состоит из 21 нуклеотида, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; и  $Y$  представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив  $XXX$  или мотивы  $ZZZ$  в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из  $XXX$  и  $ZZZ$  независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может содержать мотив  $Y'Y'Y'$ , встречающийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с первого нуклеотида от 5'-конца, или необязательно отсчет начинается с первого спаренного нуклеотида от 5'-конца в пределах дуплексного участка; и  $Y'$  представляет собой 2'-О-

метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположных концах дуплексного участка; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМe-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой нитью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId) соответственно.

Соответственно, средства для днРНКи для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, причем каждая нить содержит от 14 до 30 нуклеотидов, при этом дуплекс иРНК представлен формулой (III),

смысловая нить:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

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

(III),

где:

каждый из  $i$ ,  $j$ ,  $k$  и  $l$  независимо составляет 0 или 1;

каждый из  $p$ ,  $p'$ ,  $q$  и  $q'$  независимо составляет 0-6;

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

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

где каждый из  $n_p'$ ,  $n_p$ ,  $n_q'$  и  $n_q$ , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца; и

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

В одном варианте осуществления  $i$  составляет 0, и  $j$  составляет 0; или  $i$  составляет 1, а  $j$  составляет 0; или  $i$  составляет 0, а  $j$  составляет 1; или как  $i$ , так и  $j$  составляют 0; или как  $i$ , так и  $j$  составляют 1. В другом варианте осуществления  $k$  составляет 0, и  $l$  составляет 0; или  $k$  составляет 1, а  $l$  составляет 0;  $k$  составляет 0, а  $l$  составляет 1; или как  $k$ , так и  $l$  составляют 0; или так  $k$ , так и  $l$  составляют 1.

Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс иРНК, включают формулы, приведенные ниже:

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

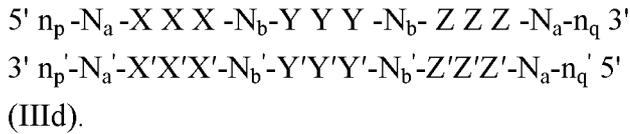
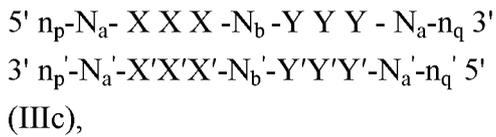
$3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$

(IIIa),

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$

(IIIb),



В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (IIIa), каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (IIIb), каждый  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (IIIc), каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (III d), каждый  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a$ ,  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

Каждый из  $X$ ,  $Y$  и  $Z$  в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (III d) может быть одинаковым или отличным от остальных.

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов  $Y$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $Y'$ . В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов  $Y$  образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $Y'$ ; или все три из нуклеотидов  $Y$  образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $Y'$ .

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (IIIb) или (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов  $Z$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $Z'$ . В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов  $Z$  образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $Z'$ ; или все три из нуклеотидов  $Z$  образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $Z'$ .

В случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (IIIc) или (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов  $X$  может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов  $X'$ . В качестве альтернативы по меньшей мере два из нуклеотидов  $X$  образуют

пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $X'$ ; или все три из нуклеотидов  $X$  образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами  $X'$ .

В определенных вариантах осуществления модификация нуклеотида  $Y$  отличается от модификации нуклеотида  $Y'$ , модификация нуклеотида  $Z$  отличается от модификации нуклеотида  $Z'$ , или модификация нуклеотида  $X$  отличается от модификации нуклеотида  $X'$ .

В определенных вариантах осуществления в случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (III<sub>d</sub>), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В других вариантах осуществления в случае, когда средство для РНКи представлено формулой (III<sub>d</sub>), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще нескольких других вариантах осуществления в случае, когда средство для РНКи представлено формулой (III<sub>d</sub>), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В других вариантах осуществления в случае, когда средство для РНКи представлено формулой (III<sub>d</sub>), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления в случае, когда средство для днРНКи представлено формулой (III<sub>a</sub>), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления средство для днРНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (III<sub>a</sub>), (III<sub>b</sub>), (III<sub>c</sub>) и (III<sub>d</sub>), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В некоторых вариантах осуществления средство для днРНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (III<sub>a</sub>), (III<sub>b</sub>), (III<sub>c</sub>) и (III<sub>d</sub>), где дуплексы соединены линкером. Линкер может

быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два средства для днРНКи, представленные по меньшей мере одной из формул (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждое из средств может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В определенных вариантах осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией или меньше. Например, средство для РНКи может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити. В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити.

В других вариантах осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению может содержать сверхмалое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 нуклеотидов, содержащих с 2'-фтор-модификацию, или меньше. Например, средство для РНКи может содержать 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления средство для РНКи может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой нити и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой нити.

В различных публикациях описаны мультимерные иРНК, которые можно применять в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

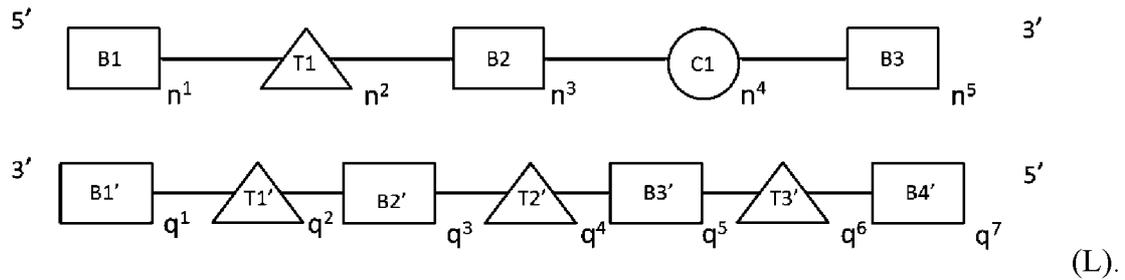
Как описано более подробно ниже, в случае иРНК, содержащей один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных с иРНК, может улучшаться одно или несколько свойств иРНК. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице иРНК. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц иРНК может быть заменен на другой фрагмент, например, отличный от углевода (предпочтительно циклический) носитель, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, обозначают в данном документе как

субъединицу с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую системой, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомом, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему или может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители содержат (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Используемая в данном документе "точка присоединения к остову" относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или в целом к связи, доступной и подходящей для встраивания носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, серосодержащий, остов рибонуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления "связывающая точка присоединения" (TAP) относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличного от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент присоединен к циклическому носителю посредством промежуточного связывающего фрагмента. Таким образом, циклический носитель зачастую будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или в целом обеспечивает связь, подходящую для введения другого химического структурного элемента, например, лиганда, в состав кольца или его связывания с кольцом.

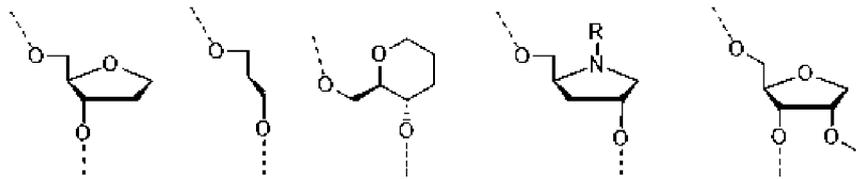
РНКи можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова на основе серинола или остова на основе диэтанолamina.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения средство на основе иРНК содержит смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Средство для РНКи может быть представлено формулой (L):



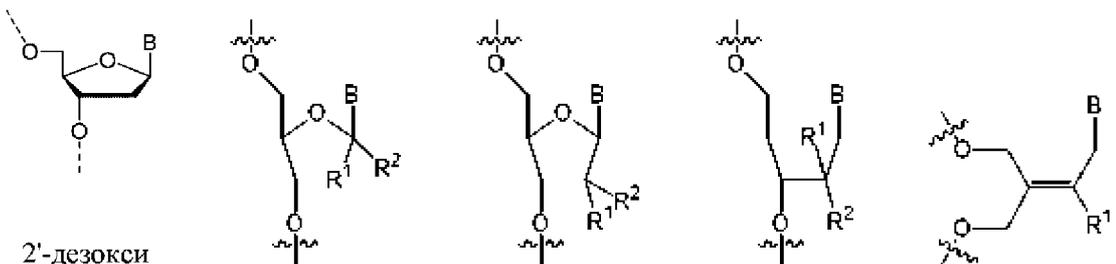
В формуле (L) каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1',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

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

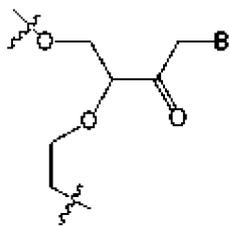


; и iii) модификации

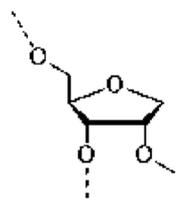
сахара, выбранной из группы, состоящей из



и



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



модификация в C1 представляет собой GNA или

Каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может находиться в 2'-положении рибозного сахара нуклеотида, или модификация может находиться в нуклеотиде, лишенном рибозы, ациклическом нуклеотиде или остоле нуклеотида в положении, которое является аналогичным или подобным 2'-положению рибозного сахара, и придает нуклеотиду стерический объем, который меньше стерического объема 2'-ОМе-модификации или равен ему. Например, каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

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

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

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

Длина  $q^5$  независимо составляет 0-10 нуклеотидов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой нити в случае,

когда длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и  $n^2$  составляет 1. В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой нити в положении 11 от 5'-конца смысловой нити в случае, когда длина смысловой нити составляет 19-22 нуклеотида, и  $n^2$  составляет 1.

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления  $n^4$  составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 6, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных



фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 6, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1.

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 5, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 5, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом необязательно по меньшей мере 2 дополнительных ТТ находятся на 3'-конце антисмысловой нити; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца

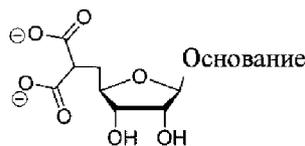


антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити).

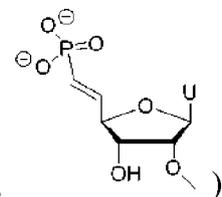
В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1.

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

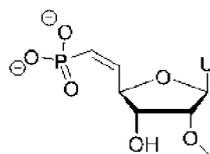
Средство для РНКи может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити или антисмысловой нити. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфотиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфодитиоат (5'-PS<sub>2</sub>), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат



(MePhos) или 5'-дезоксидезокси-5'-C-малонил ( ). В случае, когда 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-VP



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



либо изомер 5'-Z-VP (т. е. *цис*-винилфосфат, ), либо их смеси.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой нити. В одном варианте осуществления средство для РНКи





антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

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



содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup>

составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$

составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1. Средство для днРНКи на основе РНК также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксидеокси-5'-С-малонил.

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$

составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет

собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксипентанонид-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'-F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'-F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'-F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'-F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.



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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub>.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, Т3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

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

фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-P и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-P находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, T2' представляет собой 2'-F,  $q^4$  составляет 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 5, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд.

В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4, T2' представляет

собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, Т1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup>

составляет 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup> составляет 8, T1 представляет собой 2'F, n<sup>2</sup> составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>3</sup> составляет 7, n<sup>4</sup> составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n<sup>5</sup> составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>1</sup> составляет 9, T1' представляет собой 2'-F, q<sup>2</sup> составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, q<sup>4</sup> составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 7, T3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном

варианте осуществления  $5'$ -PS<sub>2</sub> находится на  $5'$ -конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на  $3'$ -конце смысловой нити.

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

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

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

фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

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

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, Т1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, В2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, В3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, Т1' представляет собой 2'-F,  $q^2$

составляет 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>3</sup> составляет 4, Т2' представляет собой 2'-F, q<sup>4</sup> составляет 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q<sup>5</sup> составляет 5, Т3' представляет собой 2'-F, q<sup>6</sup> составляет 1, В4' представляет собой 2'-F, и q<sup>7</sup> составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксипентозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксипентозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

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

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

В одном варианте осуществления В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n<sup>1</sup>

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

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-PS<sub>2</sub> и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS<sub>2</sub> находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В одном варианте осуществления B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $n^1$  составляет 8, T1 представляет собой 2'F,  $n^2$  составляет 3, B2 представляет собой 2'-ОМе,  $n^3$  составляет 7,  $n^4$  составляет 0, B3 представляет собой 2'-ОМе,  $n^5$  составляет 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^1$  составляет 9, T1' представляет собой 2'-F,  $q^2$  составляет 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^3$  составляет 4,  $q^4$  составляет 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,  $q^5$  составляет 7, T3' представляет собой 2'-F,  $q^6$  составляет 1, B4' представляет собой 2'-F, и  $q^7$  составляет 1; при этом имеются две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 смысловой нити (считая от 5'-конца смысловой нити), а также две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5'-конца антисмысловой нити). Средство для РНКи также содержит 5'-дезоксидеокси-

5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксид-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой нити, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой нити.

В конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(а) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства на основе dsРНК имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(а) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 25 нуклеотидов;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 23 нуклеотида;

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

(iii) фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 19 нуклеотидов;

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

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

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

и

(b) антисмысловую нить, имеющую

(i) участок длиной 21 нуклеотид;

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

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

где средства для РНКи имеют выступающий конец из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити.

В определенных вариантах осуществления иРНК для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из средств, перечисленных в **таблице 3, таблице 5 или таблице 6**. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

### **III. иРНК, конъюгированные с лигандами**

Другая модификация РНК из числа иРНК по настоящему изобретению предусматривает химическое связывание иРНК с одним или несколькими лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, распределение в клетке или поглощение иРНК клетками, например, в клетке. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). В других вариантах осуществления лиганд представляет собой холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), полиамин или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), или адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) или октадециламинный или гексиламинокарбонилкоксистеринный фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В определенных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства на основе иРНК, в которое он встроен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную

аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, как, например, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не принимают участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

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

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспаратат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин В12, витамин А, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида. В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую

кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид *antennapedia*, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокислота, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилители транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы тетраазамакроциклов с Eu<sup>3+</sup>), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, характеризующиеся специфической аффинностью в отношении колиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать молекулы, отличные от пептидов, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может повышать поступление средства на основе иРНК в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксол, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к иРНК, описанный в данном документе, действует в качестве фармакокинетического модулятора (РК-модулятор). РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, связываются с сывороточным белком, поэтому короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). В дополнение, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в данном документе.

Конъюгированные с лигандами иРНК по настоящему изобретению можно синтезировать с применением олигонуклеотида, который несет боковую

реакционноспособную функциональную группу, такого как полученный в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно вступать в реакцию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы как несущие любую из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно удобно и систематически получать посредством хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуют несколько компаний-производителей, включая, например, Applied Biosystems® (Фостер Сити, Калифорния, США). В качестве дополнения или альтернативы можно применять любые другие способы такого синтеза, известные в данной области техники. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированные с лигандом иРНК и специфические в отношении последовательности связанные нуклеозиды, несущие молекулу-лиганд, по настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем ДНК-синтезаторе с применением стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов лиганда и нуклеотида или нуклеозида, которые уже несут молекулу-лиганд, или отличных от нуклеозида структурных блоков, несущих лиганд.

В случае, когда применяют предшественники конъюгатов нуклеотидов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез специфических в отношении последовательности связанных нуклеозидов, как правило, завершают, а затем осуществляют реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганда и нуклеозида, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в олигонуклеотидном синтезе.

#### *А. Липидные конъюгаты*

В определенных вариантах осуществления лиганд или конъюгат представляют собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связываются с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, в отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно применять

другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно применять напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида могут: (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (б) повышать степень нацеливания или транспорта в целевую клетку или клеточную мембрану или (с) могут быть использованы для корректирования связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для подавления, например, для контроля связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, которые сильнее связываются с HSA, с меньшей вероятностью будут нацеливаться в почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будут выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, которые менее прочно связываются с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата в почки.

В определенных вариантах осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно он связывает HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткани, отличной от ткани почек. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В других вариантах осуществления лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или вообще не связывается с ним, поэтому конъюгат предпочтительно будет распределяться в почках. Другие фрагменты, которые нацеливаются в клетки почки, также можно использовать в дополнение к лиганду на основе липида или вместо него.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Такие лиганды особенно применимы для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или доброкачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамины А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины, или питательные элементы, поглощаемые целевыми клетками, например, клетками печени. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

#### *В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку*

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство, обеспечивающее проникновение в клетку. Предпочтительно средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopedia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, в том числе содержать пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, а также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазу.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также

обозначаемый в данном документе как олигопептидомиметик) представляет собой молекулу, способную к укладке в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к средствам на основе иРНК может воздействовать на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем повышения степени распознавания и абсорбции клеткой. Длина пептидного фрагмента или фрагмента-пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий преимущественно из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 15). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:16)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой "доставляющий" пептид, который может переносить крупные полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:17) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:18) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, идентифицированный в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примерами пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsРНК посредством встроенной мономерной структурной единицы, предназначенного для нацеливания на клетку, является пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-миметик. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, что облегчает нацеливание в специфическую(-ие) ткань(-и). Пептиды и пептидомиметики, содержащие RGD, могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегринов.

Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацеливаются на PECAM-1 или VEGF.

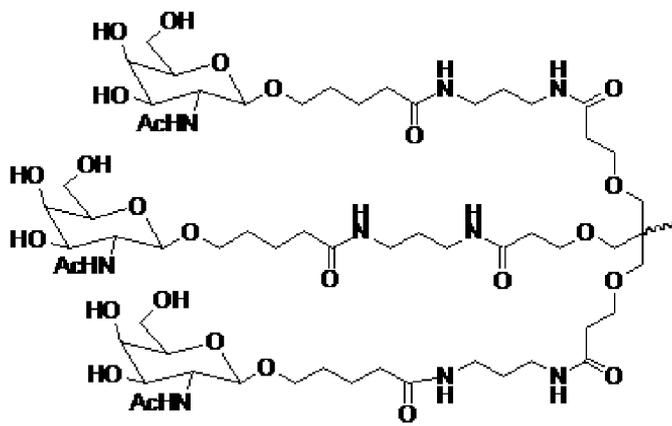
“Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку” способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как клетка бактерии или гриба, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, обеспечивающим проникновение в микробную клетку, например, может быть  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Seropin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например,  $\alpha$ -дефензин,  $\beta$ -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из крупного T-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

### *С. Углеводные конъюгаты*

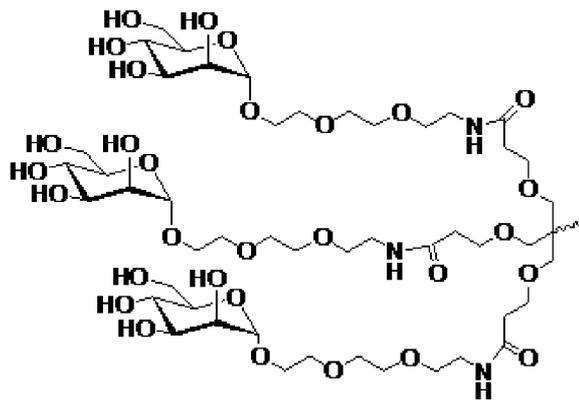
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению иРНК дополнительно содержит углевод. иРНК, конъюгированная с углеводом, предпочтительна для *in vivo* доставки нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для *in vivo* терапевтического применения, как это описано в данном документе. Используемый в данном документе термин "углевод" относится к соединению, которое представляет собой либо углевод *per se*, образованный из одной или нескольких моносахаридных структурных единиц, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединению, частью которого является углеводный фрагмент, образованный из одной или нескольких моносахаридных структурных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере шесть атомов углерода (которые могут образовывать линейную, разветвленную или циклическую структуру) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных структурных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Специфические моносахариды включают С5-сахара и сахара с большим числом атомов (например, С5, С6, С7 или С8); ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя моносахаридными структурными единицами (например, С5, С6, С7 или С8).

В определенных вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид.

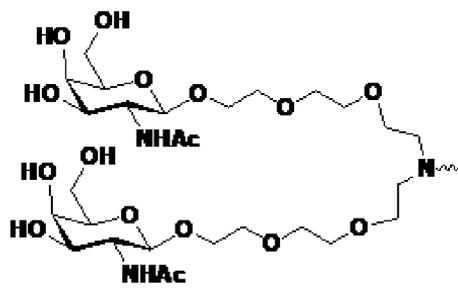
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



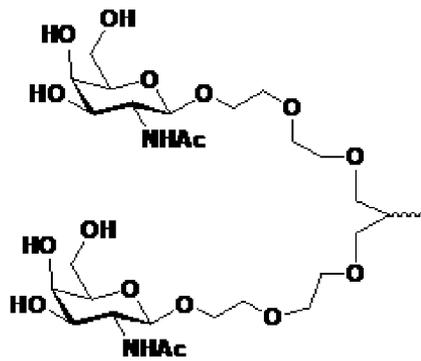
формула II,



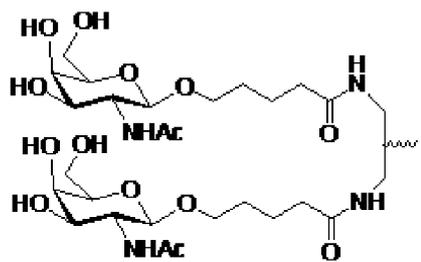
формула III,



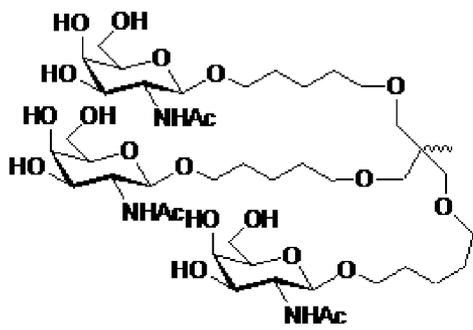
формула IV,



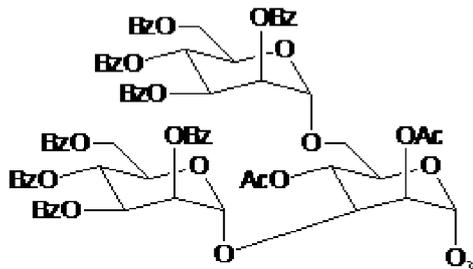
формула V,



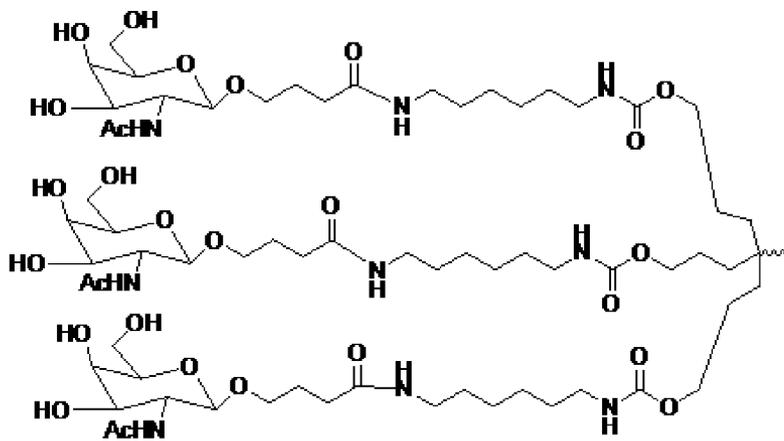
формула VI,



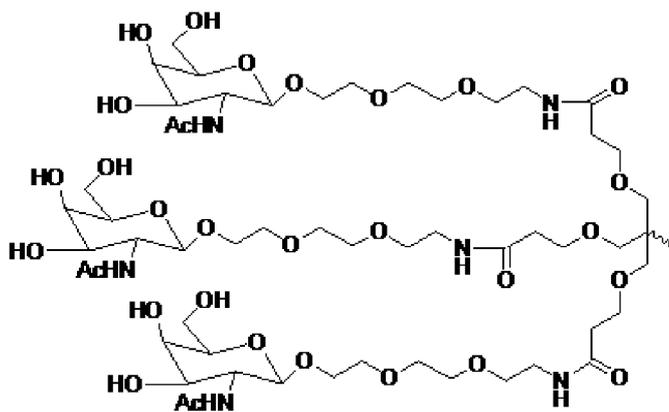
формула VII,



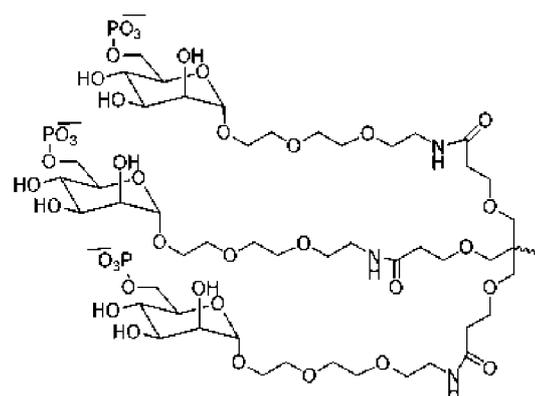
формула VIII,



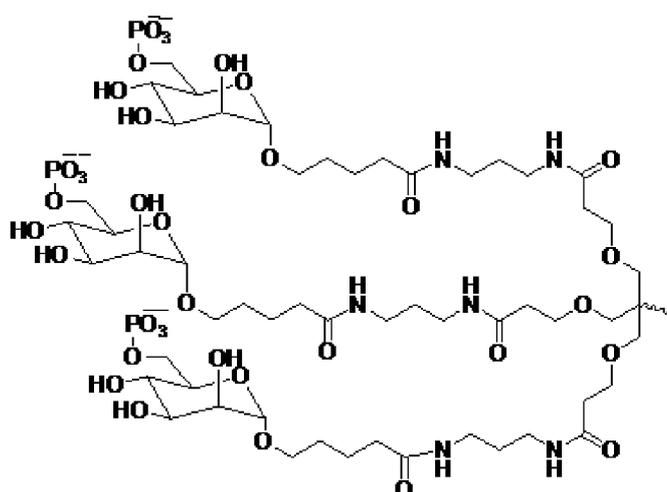
формула IX,



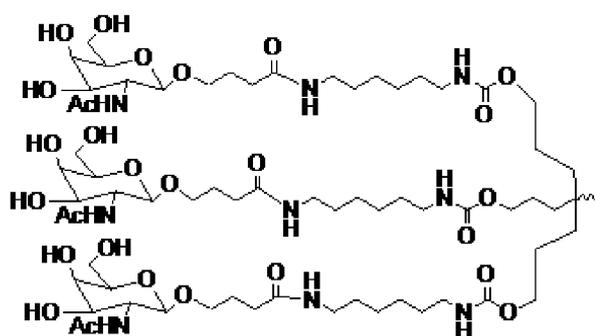
формула X,



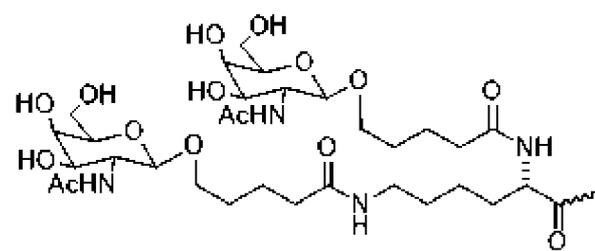
формула XI,



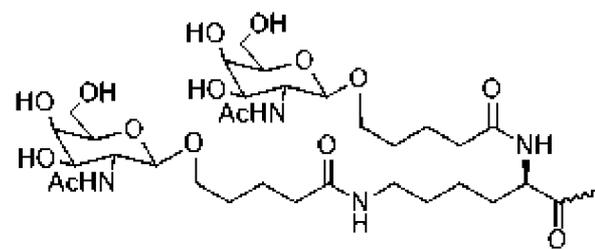
формула XII,



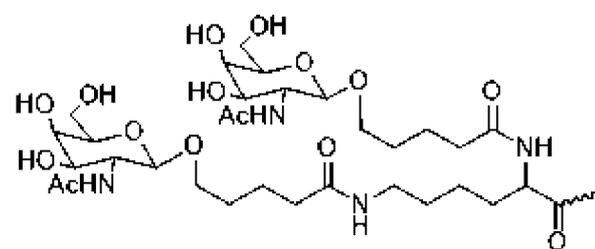
формула XIII,



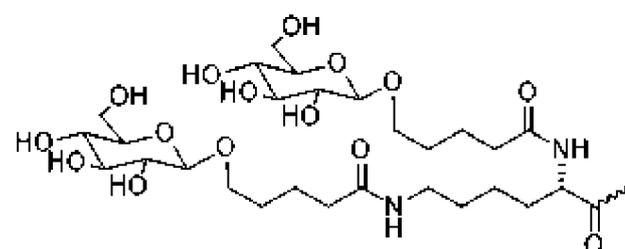
формула XIV,



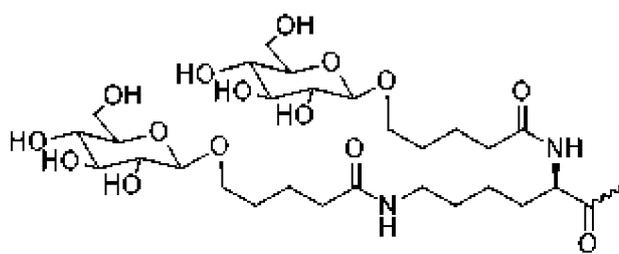
формула XV,



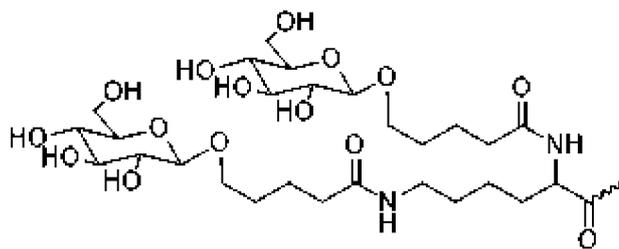
формула XVI,



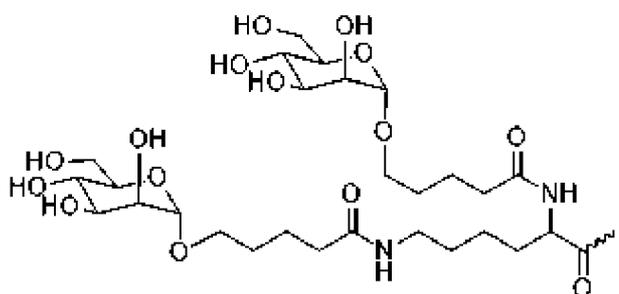
формула XVII,



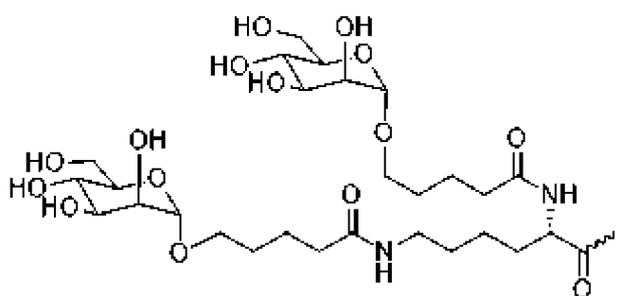
формула XVIII,



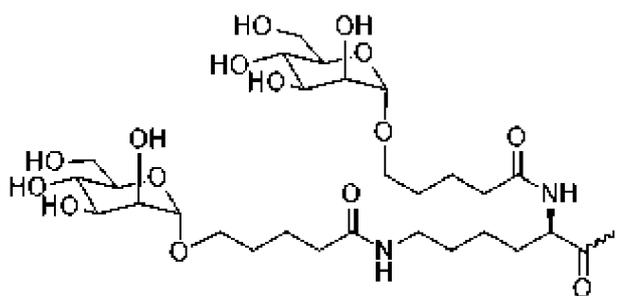
формула XIX,



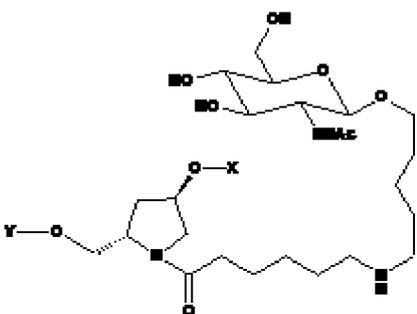
формула XX,



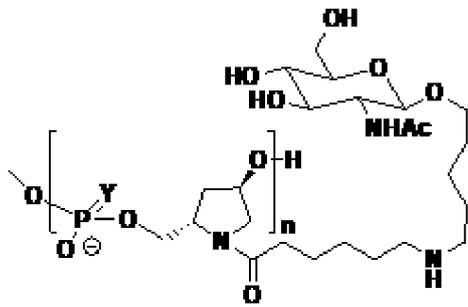
формула XXI,



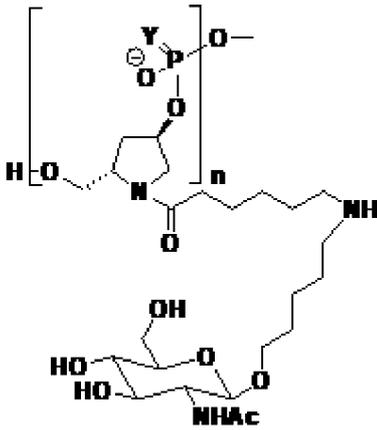
формула XXII,



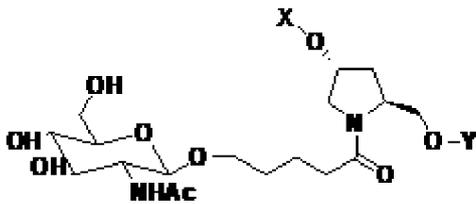
формула XXIII;



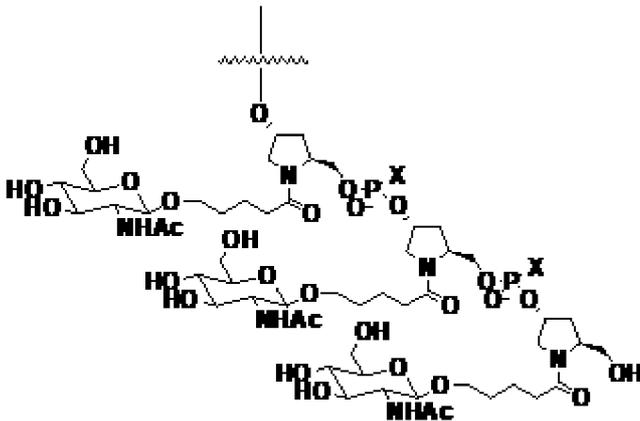
, где Y представляет собой O или S, и n составляет 3-6 (формула XXIV);



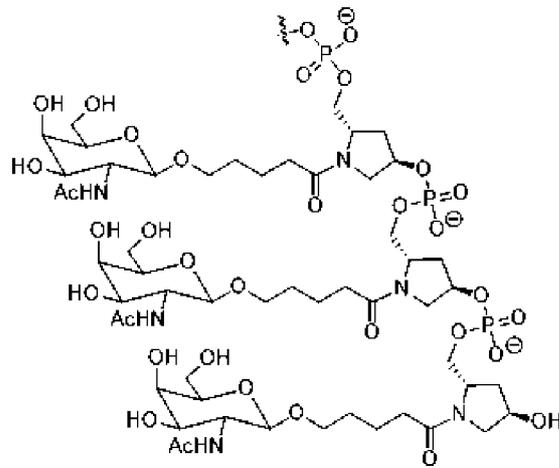
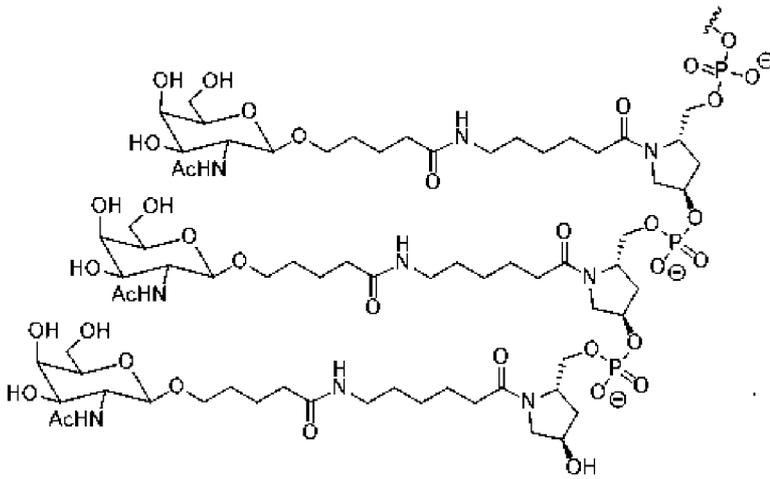
, где Y представляет собой O или S, и n составляет 3-6 (формула XXV);



формула XXVI;

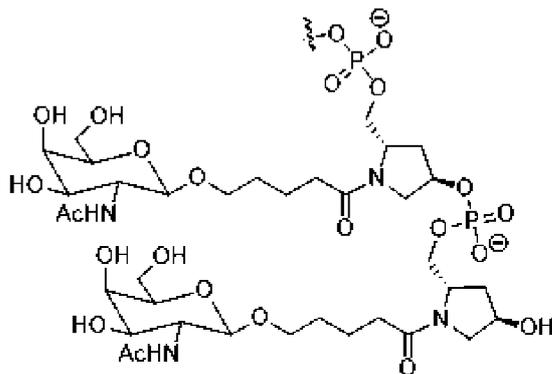
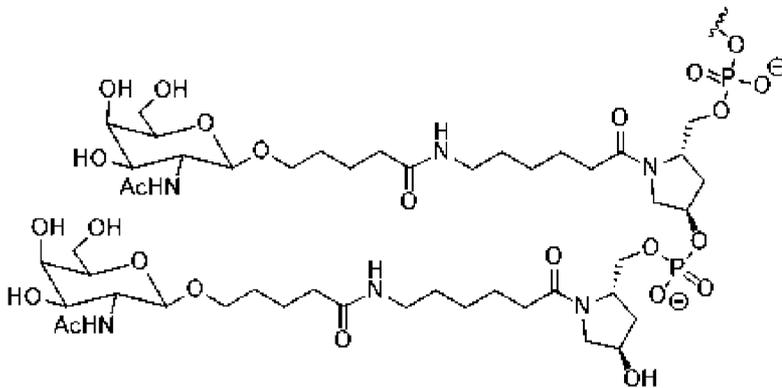


, где X представляет собой O или S (формула XXVII);



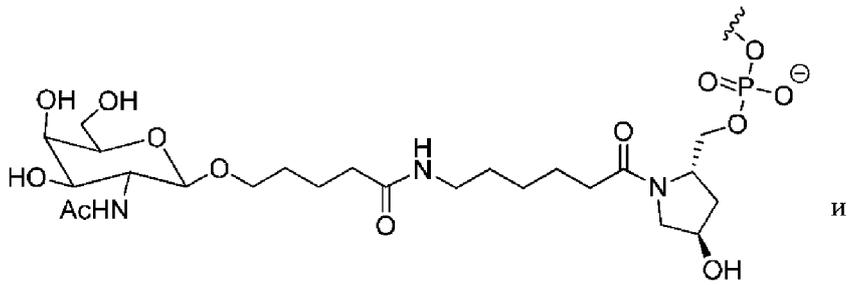
формула XXVII; формула

XXIX;

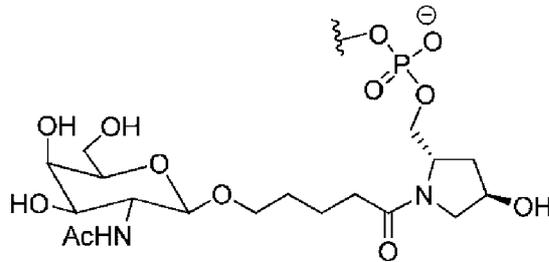


формула XXX;

формула XXXI;

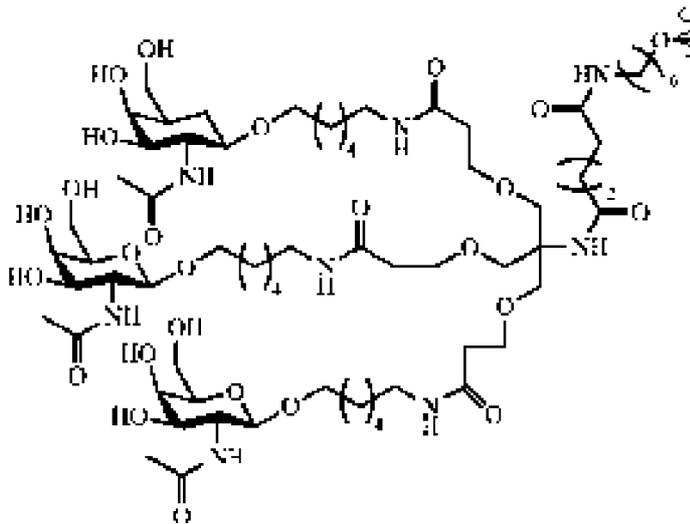


и



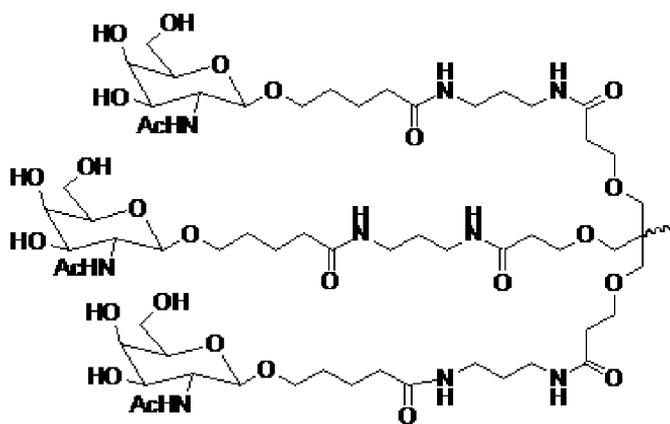
формула XXXII;

формула XXXIII;



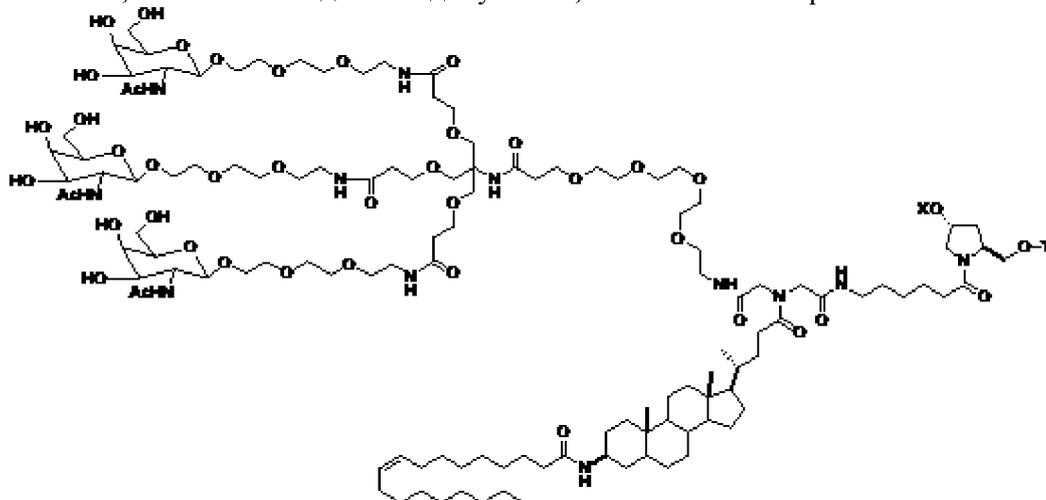
формула XXXIV.

В другом варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



формула II.

Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



(формула XXXVI),

где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, при этом другой представляет собой водород.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе иРНК по настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе иРНК по настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. В еще нескольких других вариантах осуществления настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к средству на основе иРНК по настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

В одном варианте осуществления двухнитевые средства для РНКи по настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенные к средству на основе иРНК, например, 5'-концу смысловой нити средства на основе dsРНК или 5'-концу одной или обеих смысловых нитей средства для РНКи с двойным нацеливанием, описанного в данном документе. В другом варианте осуществления двухнитевые средства для РНКи по настоящему изобретению содержат несколько (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждый из которых независимо присоединен к

нескольким нуклеотидам двухнитевого средства для РНКи посредством нескольких одновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, в случае, когда две нити средства на основе иРНК по настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующей петлю типа "шпилька", содержащую несколько неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в пределах петли типа "шпилька" может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенные посредством одновалентного линкера.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, описанных выше, таких как без ограничения РК-модулятор или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают описанные в публикациях согласно РСТ №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

#### *D. Линкеры*

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду иРНК с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин "линкер" или "линкерная группа" означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно присоединяет две части соединения. Как правило, линкеры предусматривают прямую связь или атом, такой как атом кислорода или серы, структурную единицу, такую как NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH, или цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один или несколько метиленов могут прерываться или заканчиваться O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), замещенным или незамещенным арилом,

замещенным или незамещенным гетероарилом или замещенным или незамещенным гетероциклилом; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатический или замещенный алифатический компонент. В одном варианте осуществления линкер состоит из приблизительно 1-24 атомов, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая достаточно стабильна вне клетки, но которая после поступления в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в по меньшей мере приблизительно 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или в по меньшей мере 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом эталонном условии (которое может быть выбрано, например, чтобы оно имитировало или моделировало внутриклеточные условия), чем в крови субъекта или при втором эталонном условии (которое может быть выбрано, например, чтобы оно имитировало или моделировало условия, свойственные крови или сыворотке крови).

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

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к pH. pH сыворотки крови человека составляет 7,4, в то время как средний pH внутри клетки немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым pH, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного показателя pH, вследствие чего катионный липид высвобождается из лиганда внутри клетки или в требуемом компартменте клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется под действием конкретного фермента. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной

в линкер, может зависеть от клетки, в которую происходит нацеливание. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени характеризуются высоким содержанием эстераз и, следовательно, линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, а не в типах клеток, для которых не характерно высокое содержание эстераз. Другие типы клеток с высоким содержанием эстераз включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка.

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

Как правило, пригодность кандидатной расщепляемой линкерной группы можно оценить путем тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту кандидатную линкерную группу. Кроме того, желательно также тестировать кандидатную расщепляемую линкерную группу в отношении способности противостоять расщеплению в крови или в случае контакта с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению при первом и втором условиях, где первое выбрано, чтобы продемонстрировать расщепление в целевой клетке, а второе выбрано, чтобы продемонстрировать расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно провести первичное оценивание в бесклеточных условиях или условиях культуры и подтвердить путем дальнейшего оценивания на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые кандидатные соединения расщепляются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или условиями *in vitro*, выбранными для имитации внеклеточных условий).

*і. Линкерные группы, расщепляемые с помощью окислительно-восстановительных реакций*

В определенных вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую с помощью окислительно-восстановительных реакций линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Чтобы определить, подходит ли кандидатная расщепляемая линкерная группа в качестве "расщепляемой при восстановлении линкерной группы" или, например, подходит ли для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидатное соединение можно оценивать путем инкубации с дитиотреитолом (ДТТ) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая будет

наблюдаться в клетке, например, целевой клетке. Кандидатные соединения также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки крови. В одном варианте осуществления расщепление кандидатных соединений в крови составляет не более приблизительно 10%. В других вариантах осуществления применимые кандидатные соединения разрушаются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или в приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или условиями *in vitro*, выбранными для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с применением стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

*ii. Фосфатные расщепляемые линкерные группы*

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит фосфатную расщепляемую линкерную группу. Фосфатная расщепляемая линкерная группа расщепляется под действием средств, которые разрушают или осуществляют гидролиз фосфатной группы. Примером средства, которое расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами фосфатных линкерных групп являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными вариантами осуществления являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- и -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

*iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы*

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде при pH, составляющем приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или с помощью таких средств, как ферменты, которые могут выступать в роли универсальной кислоты. В клетке расщепляющую среду для расщепляемых кислотами линкерных групп могут обеспечить специфические органеллы, характеризующиеся низким pH, такие как эндосомы и лизосомы. Примеры расщепляемых кислотами линкерных групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотами группы могут характеризоваться общей формулой -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Предпочтительным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода,

присоединенный к кислороду сложноэфирной группы (в алкоксигруппе), входит в состав арильной группы, замещенной алкильной группы или четвертичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

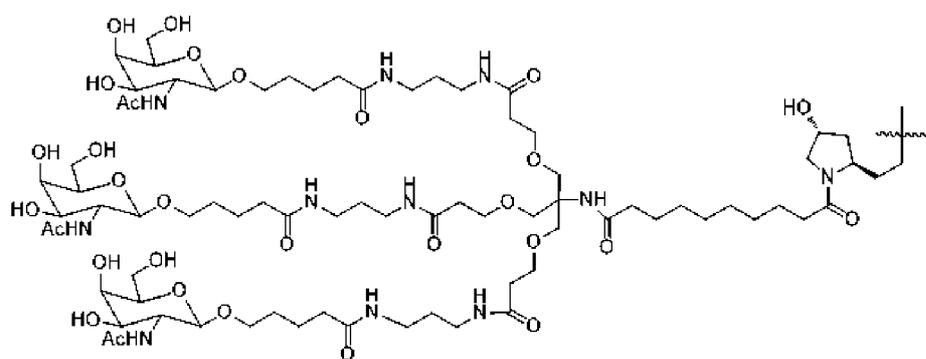
*iv. Сложноэфирные линкерные группы*

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит сложноэфирную расщепляемую линкерную группу. Сложноэфирная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках под действием ферментов, таких как эстеразы и амидазы. Примеры сложноэфирных расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложноэфирные производные алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

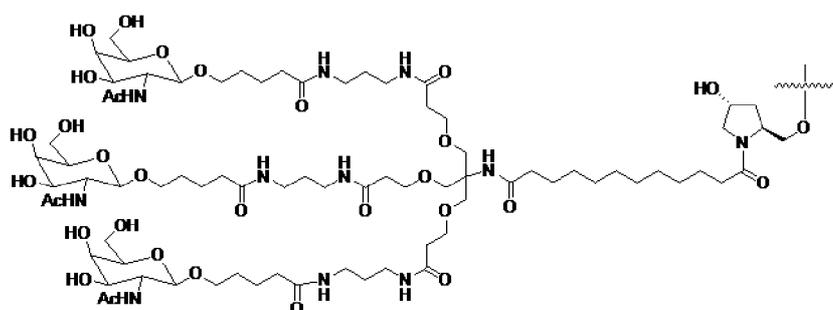
*v. Пептидные расщепляемые группы*

В еще нескольких других вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает пептидную расщепляемую линкерную группу. Пептидная расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках под действием ферментов, таких как пептидазы и протеазы. Пептидные расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образуемые между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не включают амидную группу ( $-C(O)NH-$ ). Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образуемый между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа, как правило, ограничивается пептидной связью (т. е. амидной связью), образуемой между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Пептидные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой  $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$ , где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидатные соединения можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

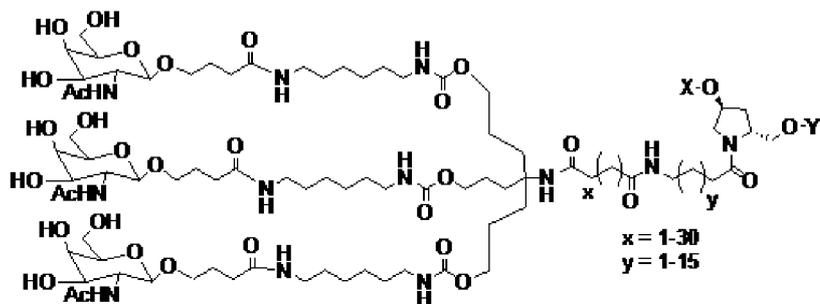
В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами в композициях и способах по настоящему изобретению включают без ограничения



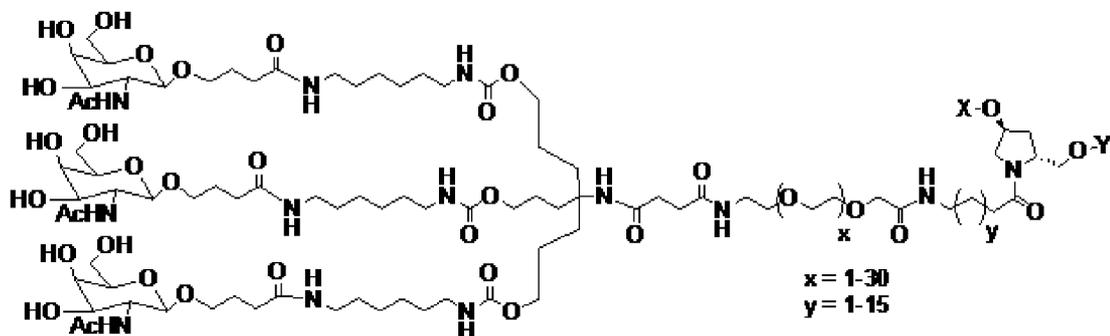
(формула XXXVII),



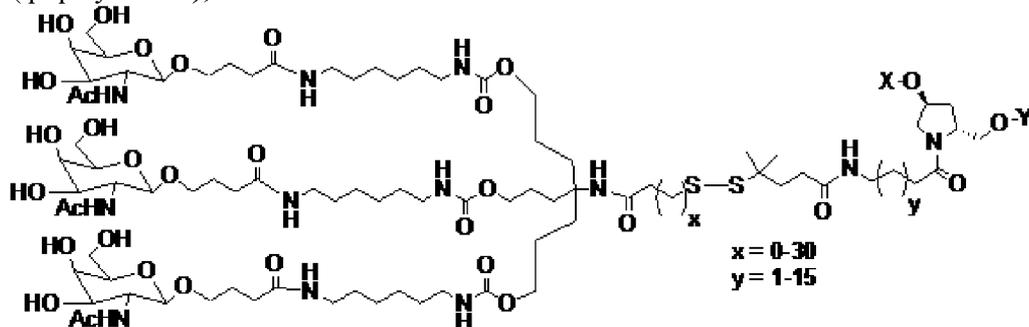
(формула XXXVIII),



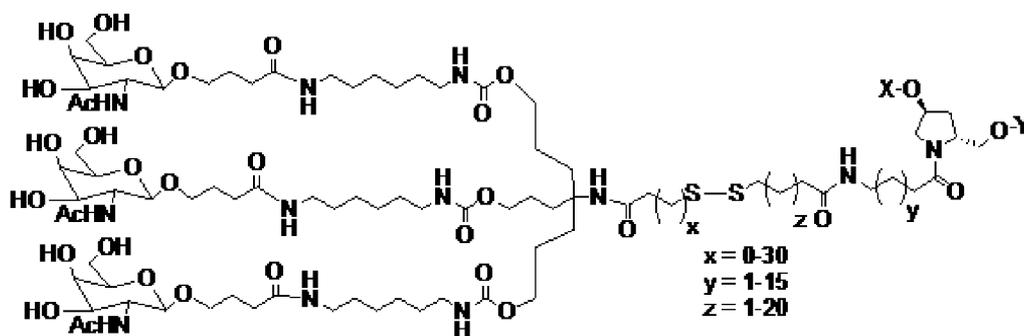
(формула XXXIX),



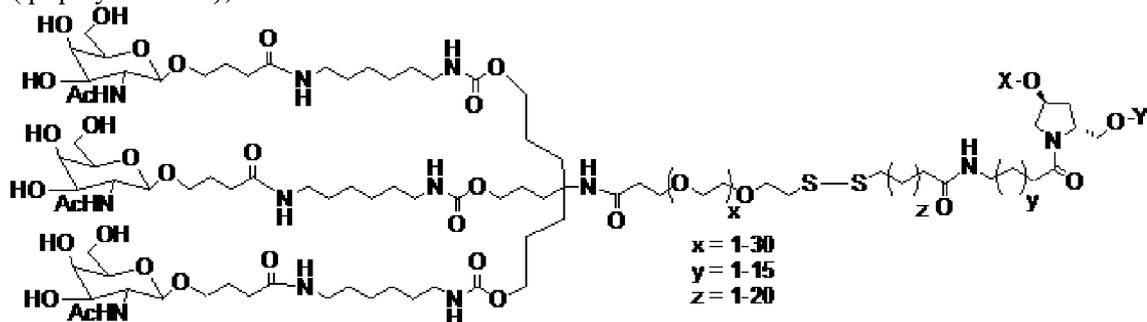
(формула XL),



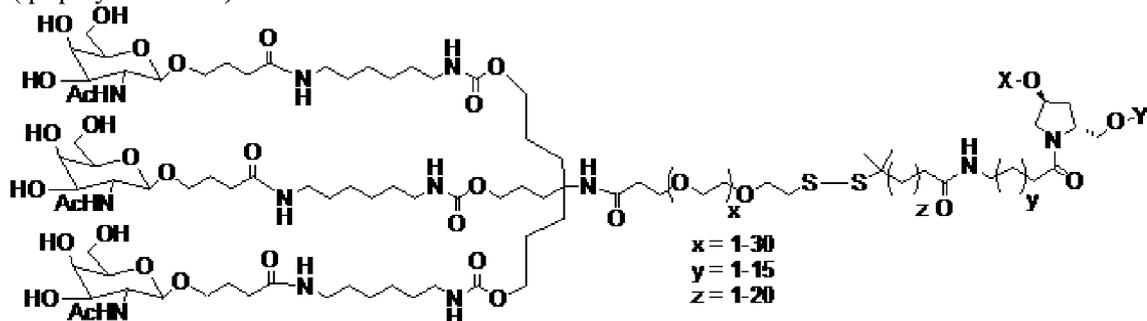
(формула XLI),



(формула XLII),



(формула XLIII) и

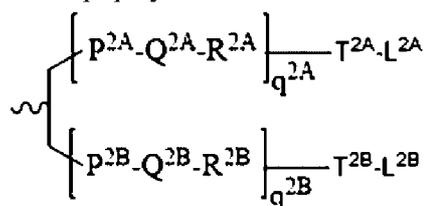


(формула XLIV), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, а другой представляет собой водород.

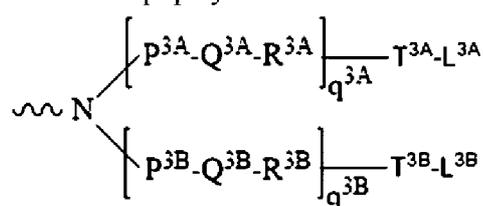
В определенных вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

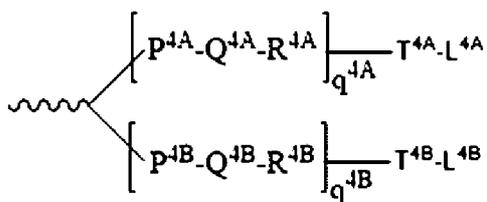
В одном варианте осуществления дсРНК по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

формула XXXXV



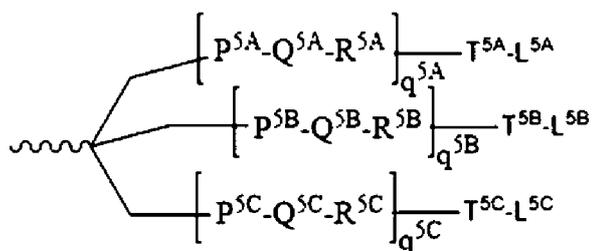
формула XLVI





формула XLVII

или



формула XLVIII

где:

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

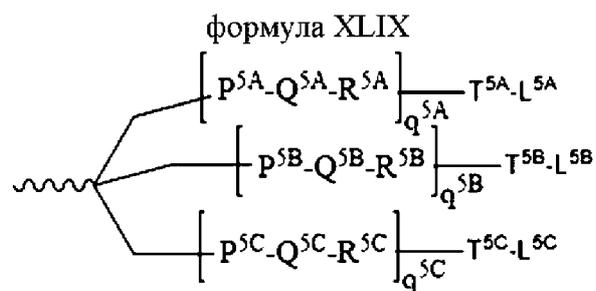
каждый из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствуют или представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждый из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-



$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т. е. каждый из них независимо в каждом случае представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные линкеры, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, особенно применимы в использовании со средствами для РНКи для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как характеризующиеся формулой (XLIX):



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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNac, включают без ограничения структуры, указанные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение конъюгатов РНК, включают без ограничения патенты США №№ 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928; 5,688,941; 6,294,664; 6,320,017; 6,576,752; 6,783,931; 6,900,297; 7,037,646; и 8,106,022, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Необязательно, чтобы все положения в указанном соединении были модифицированы однотипно, и, по сути, более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения на основе иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

"Химерные" соединения на основе иРНК или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения на основе иРНК, предпочтительно средства для днРНКи, которые содержат два или более химически отличающихся участка, каждый из которых состоит из по меньшей мере одной мономерной структурной единицы, т. е. нуклеотида в случае соединения на основе дсРНК. Такие иРНК, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким способом, чтобы придать иРНК повышенную устойчивость к разрушению нуклеазами, повышенное поглощение клеткой или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКазы Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы Н, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени,

вследствие чего значительно повышается эффективность ингибирования экспрессии гена с помощью иРНК. Следовательно, зачастую, если применять химерные дсРНК, сравнимые результаты можно получить с более короткими иРНК по сравнению с фосфотиоатными дезокси-дсРНК, гибридизирующимися с тем же целевым участком. Расщепление РНК-мишени традиционно можно обнаруживать с помощью гель-электрофореза и при необходимости с помощью ассоциированных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

В определенных случаях РНК из числа иРНК может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Целый ряд молекул, не являющихся лигандами, конъюгировали с иРНК для усиления активности, распределения в клетках или поглощения иРНК клеткой, и процедуры для выполнения таких типов конъюгации доступны в научной литературе. Такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включали липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическая цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиаминовая или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), или адамантануксусная кислота (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламинный или гексиламинокарбонилкоксихолестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Репрезентативные патенты США, в которых изложено получение таких конъюгатов РНК, были перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации предусматривают синтез РНК, несущих линкер с аминогруппой в одном или нескольких положениях последовательности. Затем осуществляют реакцию аминогруппы с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего связующего или активирующего реагентов. Реакцию конъюгации можно выполнять либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК, в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

#### **IV. Доставка иРНК по настоящему изобретению**

Доставку иРНК по настоящему изобретению в клетку, например, клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, нуждающийся в этом субъект, такой как субъект, предрасположенный к развитию ассоциированного с AGT нарушения, например, гипертензии, или у которого оно диагностировано) можно осуществлять различными

путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. *In vivo* доставку также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей иРНК, например, дсРНК. В качестве альтернативы *in vivo* доставку можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют иРНК и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно обсуждаются ниже.

В целом любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме). Что касается *in vivo* доставки, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращения неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани. Также было показано, что РНК-интерференция является успешной при локальной доставке в ЦНС путем прямой инъекции (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602). Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут обеспечивать нацеливание иРНК в целевую ткань, и с их помощью можно избежать неблагоприятных нецелевых эффектов. Молекулы иРНК можно модифицировать с помощью химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для увеличения поглощения клеткой и предотвращения разрушения. Например, иРНК, направленную против АроВ, которая конъюгирована с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, вводили системным путем мышам, что приводило к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178).

В альтернативном варианте осуществления иРНК можно доставлять с помощью систем для доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система для доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно либо связывать с иРНК, либо индуцировать для образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH, *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает разрушение иРНК при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионный липид-иРНК находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см., например, Sorensen, DR, *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, *et al* (2003) *Clin. Pak Res.* 9:1291-1300; Arnold,

AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Некоторые неограничивающие примеры систем для доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003) выше; Verma, UN, *et al* (2003), выше), "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY, *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды, содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), и полиамидоамины (Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления для системного введения иРНК образует комплекс с циклодекстрином. Способы введения и фармацевтические композиции на основе иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

*A. Кодированные вектором иРНК по настоящему изобретению*

иРНК, нацеливающаяся на ген AGT, может экспрессироваться за счет структурных единиц транскрипции, встроенных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A, *et al.*, публикацию международной заявки согласно РСТ № WO 00/22113, Conrad, публикацию международной заявки согласно РСТ № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка нескольких часов - недель) или длительной (недели - месяцы или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевой ткани или типа клеток. Эти трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Также можно конструировать трансген, который может наследоваться в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Системы на основе вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения: (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиноного лейкоза Молони и т. д; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвирус, например, поксвируса канареек или вируса оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости конструкции могут включать вирусные последовательности, служащие для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы на основе EPV и EBV.

Для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках обычно в конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК будут требоваться наличие регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т. д. Из уровня техники известны другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций.

#### **V. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению**

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, описанную в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, являются применимыми для предупреждения или лечения нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем подкожной (SC), внутримышечной (IM) или внутривенной (IV) доставки. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для подавления экспрессии гена AGT.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для подавления экспрессии гена AGT. В целом, подходящая доза иРНК по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в день, обычно в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Как правило, подходящая доза иРНК по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 5,0 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,0 мг/кг. Схема с повторным введением доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, как, например, один раз в месяц, один раз каждые 3-6 месяцев или один раз в год. В определенных вариантах осуществления иРНК вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в шесть месяцев.

По завершению начальной схемы лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Продолжительность лечения можно определять на основании тяжести заболевания.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что дозы вводят с интервалами не более 1, 2, 3, или 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят приблизительно один раз в месяц. В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в квартал (т. е. приблизительно через каждые три месяца). В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу

фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в год (т. е. приблизительно один раз каждые шесть месяцев).

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения мутации, присутствующие у субъекта, виды предшествующего лечения, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие сопутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта с помощью профилактически или терапевтически эффективного количества композиции, в зависимости от ситуации, может включать один период лечения или несколько периодов лечения.

иРНК можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Составы включают такие, которые нацеливаются на печень.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать в соответствии с традиционными методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим(-ими) носителем(-ями) или наполнителем(-ями). В целом составы получают путем однородного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями.

#### *А. Дополнительные составы*

##### *i. Эмульсии*

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные системы из одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см. например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Зачастую эмульсии представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. В целом эмульсии могут представлять собой эмульсии по типу либо "вода в

масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В случае, когда водная фаза мелко разделена и диспергирована в виде мельчайших капелек в общем объеме масляной фазы, полученную композицию называют эмульсией "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы в случае, когда масляная фаза мелко разделена и диспергирована в виде мельчайших капелек в общем объеме водной фазы, полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты помимо диспергированных фаз и активного лекарственного средства, которое может присутствовать либо в виде раствора в водной фазе, масляной фазе, либо само по себе в качестве отдельной фазы. При необходимости в эмульсиях также могут присутствовать фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w заключают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогичным образом, система масляных капелек, заключенная в сферических частицах воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию по типу o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Зачастую диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме за счет эмульгаторов или вязкости состава. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. В широком смысле эмульгаторы могут быть разделены на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные основы и тонкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составлении эмульсий, и они были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Как правило, поверхностно-активные вещества являются амфифильными веществами и содержат гидрофильную и гидрофобную часть.

Соотношение гидрофильности и гидрофобности поверхностно-активного вещества было названо гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно представляет собой ценный инструмент для классификации и осуществления выбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества могут быть разделены на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионогенные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

В эмульсионные составы также включают множество неэмульгирующих материалов, и они обуславливают определенные свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Применение эмульсионных составов посредством дермального, перорального и парентерального путей введения и способы их получения рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

#### *ii. Микроэмульсии*

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе иРНК и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определить как систему из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см. например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии являются системами, которые получают вначале путем диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта со средней длиной цепи, для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизированы межфазными пленками из поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215).

#### *iii. Микрочастицы*

иРНК по настоящему изобретению может быть включена в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать путем высушивания распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, вакуумной сушкой или с помощью комбинации данных методик.

#### *iv. Усилители проникновения*

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных используют разнообразные усилители. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана усилителем проникновения. В дополнение к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из вышеупомянутых классов усилителей проникновения и их применение при получении фармацевтических композиций и доставке фармацевтических средств хорошо известны в данной области техники.

#### *v. Наполнители*

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду-носитель, предназначенную для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения таким образом, чтобы обеспечить необходимый общий объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Такие средства широко известны в данной области техники.

#### *vi. Другие компоненты*

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области техники. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как например противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать

дополнительные материалы, применимые для физического составления композиций по настоящему изобретению в виде различных лекарственных форм, такие как красители, вкусоароматические средства, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно препятствовать проявлению биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно подвергать стерилизации и при необходимости смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами или отдушками и т. п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой(-ыми) кислотой(-ами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, включают: (а) одну или несколько иРНК и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от механизма действия иРНК, и которые применимы в лечении нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии.

Токсичность и профилактическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, вызывающей гибель 50% популяции) и ED50 (дозы, являющейся профилактически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз, обуславливающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные в анализах на культурах клеток и в исследованиях на животных, можно применять при составлении диапазона доз для применения у людей. В настоящем изобретении дозировка композиций, представленных в данном документе в целом находится в диапазоне концентраций соединения, циркулирующего в крови, который включает ED50, предпочтительно ED80 или ED90, при низкой токсичности или отсутствии токсичности. Доза может варьироваться в данном диапазоне в зависимости от используемых лекарственной формы и пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, профилактически эффективную дозу можно изначально установить по результатам анализов на культурах клеток. Для животных моделей дозу можно составлять таким образом, чтобы достичь диапазон концентрации соединения, циркулирующего в плазме крови, или, в соответствующих случаях, содержание полипептидного продукта целевой последовательности (например, достичь снижение концентрации полипептида), что

предусматривает IC50 (т. е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное подавление симптомов) или более высоких уровней подавления, как определено на культуре клеток. Такую информацию можно применять для более точного определения доз, применимых у людей. Уровни в плазме крови можно измерять, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждаемому выше, иРНК, представленные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, применяемыми для предупреждения или лечения нарушения, ассоциированного с AGT, например, гипертензии. В любом случае врач, осуществляющие применение, может корректировать количество и период введения иРНК, исходя из результатов, наблюдаемых с применением стандартных показателей эффективности, известных из уровня техники или описанных в данном документе.

#### **VI. Способы подавления экспрессии AGT**

В настоящем изобретении также предусмотрены способы подавления экспрессии гена AGT в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для РНКи, например, средством на основе двухнитевой РНК, в количестве, эффективном для подавления экспрессии AGT в клетке, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии AGT в клетке.

Приведение клетки в контакт с иРНК, например, средством на основе двухнитевой РНК, можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт с иРНК *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт с иРНК. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*. Приведение клетки в контакт может быть прямым или опосредованным, как это рассматривалось выше. Более того, приведение клетки в контакт можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc<sub>3</sub> или любой другой лиганд, который направляет средство для РНКи к представляющему интерес сайту.

Используемый в данном документе термин "подавление" используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией", "супрессией" и другими аналогичными терминами, при этом он включает любой уровень подавления.

Подразумевается, что фраза "подавление экспрессии AGT" относится к подавлению экспрессии любого гена AGT (такого как, например, ген AGT мыши, ген AGT крысы, ген AGT обезьяны или ген AGT человека), а также вариантов или мутантов гена AGT. Таким образом, ген AGT может представлять собой ген AGT дикого типа, мутантный ген AGT или трансгенный ген AGT в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Подавление экспрессии гена AGT" включает любой уровень подавления гена AGT,

например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена AGT. Экспрессию гена AGT можно оценивать на основании уровня или изменения уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена AGT, например, уровня мРНК AGT или уровня белка AGT. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта. Понятно, что AGT экспрессируется преимущественно в печени, но также и в головном мозге, желчном пузыре, сердце и почке и присутствует в кровотоке.

Подавление можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые ассоциированы с экспрессией AGT, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используют в данной области техники, например, уровень в начальный момент времени до введения дозы или уровень, определенный у сходного субъекта, клетки или образца, не обработанных или обработанных контролем (таким как, например, контроль с введением только буфера или контроль с введением неактивного средства).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена AGT подавляется на по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или до уровня, который ниже уровня выявления в анализе. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия гена AGT подавляется на по меньшей мере 70%. Также понятно, что может потребоваться подавление экспрессии AGT в определенных тканях, например, в печени, без значительного подавления экспрессии в других тканях, например, в головном мозге. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с использованием способа анализа, представленного в примере 2, с онРНК при концентрации 10 нМ в подходящей линии клеток соответствующего вида.

В определенных вариантах осуществления подавление экспрессии *in vivo* определяют по нокдауну гена человека у грызуна, экспрессирующего ген человека, например, у инфицированной с помощью AAV мыши, экспрессирующей целевой ген человека (т. е. AGT), например, при введении однократной дозы 3 мг/кг в момент максимального снижения экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в системе животной модели также можно определять, например, после введения однократной дозы 3 мг/кг в момент максимального снижения экспрессии РНК. Такие системы применимы в том случае, когда последовательность нуклеиновой кислоты гена человека и гена модельного животного достаточно близки, вследствие чего иРНК к гену человека обеспечивает эффективный нокдаун гена модельного животного. Экспрессию РНК в печени определяют с применением способов на основе ПЦР, представленных в примере 2.

Подавление экспрессии гена AGT может проявляться как снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген AGT и которая или которые подвергали обработке (например,

посредством приведения клетки или клеток в контакт с иРНК по настоящему изобретению или посредством введения иРНК по настоящему изобретению субъекту, в организме которого присутствуют или присутствовали клетки), так что экспрессия АГТ подавляется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, практически идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не подвергали такой обработке (контрольная(-ые) клетка(-и), которые не обрабатывали с помощью иРНК или не обрабатывали с помощью иРНК, нацеливающейся на представляющий интерес ген). В предпочтительных вариантах осуществления подавление оценивают с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием онРНК при концентрации 10 нМ, в линии клеток соответствующего вида и выражая уровень мРНК в обработанных клетках в виде процентной доли от уровня мРНК в контрольных клетках с применением следующей формулы:

$$\frac{(\text{mRNA в контрольных клетках}) - (\text{mRNA в обработанных клетках})}{(\text{mRNA в контрольных клетках})} \bullet 100\%.$$

В других вариантах осуществления подавление экспрессии гена АГТ можно оценивать с точки зрения уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией гена АГТ, например, уровня белка АГТ в крови или сыворотке крови от субъекта. Сайленсинг гена АГТ можно определять в любой клетке, которая экспрессирует АГТ либо эндогенно, либо гетерологично с экспрессионной конструкции, и с помощью любого анализа, известного из уровня техники.

Подавление экспрессии белка АГТ может проявляться как снижение уровня белка АГТ, который экспрессируется клеткой или группой клеток или в образце от субъекта (например, уровня белка в образце крови, полученном от субъекта). Как объяснялось выше для оценки супрессии мРНК, подавление уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток аналогичным образом можно выражать в виде процентной доли от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток или изменения уровня белка в образце от субъекта, например, крови или сыворотке крови, полученных от него.

Контрольная клетка, группа клеток или образец от субъекта, которые можно применять для оценки подавления экспрессии гена АГТ, включают клетку, группу клеток или образец от субъекта, которые еще не приводили в контакт со средством для РНКи по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка, группа клеток или образец от субъекта могут быть получены из отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта с помощью средством для РНКи или из соответствующим образом совпадающей контрольной популяции.

Уровень мРНК АГТ, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять с помощью любого способа оценки экспрессии мРНК, известного из уровня техники. В одном варианте осуществления уровень экспрессии АГТ в образце определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например мРНК гена АГТ. РНК можно экстрагировать из клеток с помощью методик экстрагирования РНК, в том числе, например, экстрагирования с помощью кислого

фенола/гуанидинизотиоцианата (RNazol B; Biogenesis), наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene™ (PreAnalytix™, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используют гибридизацию рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* гибридизацию и микроматричные анализы.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии AGT определяют с использованием зонда на основе нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин "зонд" относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться со специфическим AGT. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды можно специально разрабатывать так, чтобы они содержали метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения Саузерн- или нозерн-блоттинг-анализы, анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализы с применением зонда. Один способ определения уровней мРНК предусматривает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК AGT. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, например, нитроцеллюлозную. В альтернативном варианте осуществления зонд(-ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(-ами), например, на матрице GeneChip Affymetrix®. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для применения в определении уровня мРНК AGT.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии AGT в образце предусматривает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или применение обратной транскриптазы (с получением кДНК), например, мРНК в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления, изложенный в патенте США № 4683202 Mullis, 1987), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), применение Q-бета репликазы (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты с последующим выявлением амплифицированных молекул с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Такие схемы выявления особенно применимы для выявления молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии AGT определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR

(т. е. системы TaqMan™). В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием онРНК при концентрации 10 нМ, в линии клеток соответствующего вида.

Уровни экспрессии мРНК AGT можно отслеживать с использованием мембранного блота (как, например, используемого в гибридизационном анализе, таком как нозерн-, Саузерн-, дот-блот-анализ и т. п.) или микролунок, пробирок для отбора образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии AGT также может предусматривать использование зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с применением анализов с разветвленной ДНК (рДНК) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием онРНК при концентрации 10 нМ, в линии клеток соответствующего вида.

Уровень экспрессии белка AGT можно определить с использованием любого способа измерения уровней белка, известного из уровня техники. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т. п.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению оценивают по снижению уровня мРНК AGT или белка (например, при биопсии печени).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство на основе иРНК вводят субъекту так, что иРНК доставляется в специфический сайт в организме субъекта. Подавление экспрессии AGT можно оценивать с использованием измерений уровня или изменения уровня мРНК AGT или белка agt в образце, полученном из жидкости или ткани из специфического сайта в организме субъекта (например, печени или крови).

Используемые в данном документе термины "выявление или определение" уровня анализа следует понимать, как означающие выполнение стадий определения в случае присутствия материала, например, белка, РНК. Используемые в данном документе способы

выявления или определения включают выявление или определение уровня анализа, который ниже уровня выявления для используемого способа.

### **VII. Способы профилактики и лечения по настоящему изобретению**

В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения иРНК по настоящему изобретению или композиции, содержащей иРНК по настоящему изобретению, для подавления экспрессии AGT, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение нарушения, ассоциированного с AGT, например, высокого кровяного давления, гипертензии.

В способах по настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт с siРНК *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клетка, подходящая для лечения с помощью способов по настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген AGT, например, клетку печени, клетку головного мозга, клетку желчного пузыря, клетку сердца или клетку почки, но предпочтительно клетку печени. Клетка, подходящая для применения в способах по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (как, например, человеческую клетку, в том числе человеческую клетку в химерном животном, не являющемся человеком, или клетку примата, отличного от человека, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе) или клетку животного, отличного от примата. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека. В способах по настоящему изобретению экспрессия AGT в клетке подавляется на по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или до уровня, который ниже уровня выявления анализа.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена AGT млекопитающего, которому будет вводиться средство для РНКи. Композицию можно вводить любым путем, известным в данной области техники, в том числе без ограничения пероральным, внутривенным или парентеральным путями, включая интракраниальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (в том числе трансбуккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутримышечной инъекции.

В одном аспекте настоящее изобретение также предусматривает способы подавления экспрессии гена AGT у млекопитающего. Способы предусматривают введение млекопитающему композиции, содержащей dsРНК, которая нацеливается на ген AGT в клетке млекопитающего, и поддержание жизнедеятельности млекопитающего в течение времени, достаточного для осуществления разрушения мРНК-транскрипта гена AGT, за

счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена AGT в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области техники, и с помощью способов, например, qRT-PCR, описанных в данном документе, например, в примере 2. Снижение выработки белка можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области техники, например, ELISA. В определенных вариантах осуществления образец, полученный пункционной биопсией печени, служит в качестве тканевого материала для отслеживания снижения экспрессии гена или белка AGT. В других вариантах осуществления образец крови служит в качестве образца от субъекта для отслеживания снижения экспрессии белка agt.

В настоящем изобретении дополнительно представлены способы лечения нуждающегося в этом субъекта, например, субъекта, у которого диагностирована гипертензия.

В настоящем изобретении дополнительно представлены способы профилактики у нуждающегося в этом субъекта. Способы лечения по настоящему изобретению предусматривают введение иРНК по настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, у которого снижение экспрессии AGT будет оказывать благоприятное воздействие, в виде профилактически эффективного количества иРНК, нацеливающейся на ген AGT, или фармацевтической композиции, содержащей иРНК, нацеливающейся на ген AGT.

иРНК по настоящему изобретению можно вводить в виде "свободной иРНК". Свободную иРНК вводят при отсутствии фармацевтической композиции. "Голая" иРНК может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может предусматривать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего иРНК, можно регулировать так, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы иРНК по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав с dsРНК.

Субъекты, у которых подавление экспрессии гена AGT оказывает благоприятное воздействие, представляют собой субъектов, предрасположенных к развитию гипертензии, или тех, у кого она была диагностирована.

В одном варианте осуществления способ предусматривает введение композиции, представленной в данном документе, так что экспрессия гена-мишени AGT уменьшается, как, например, на протяжении приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев при введении одной дозы. В определенных вариантах осуществления композицию вводят один раз каждые 3-6 месяцев.

иРНК, применимые в способах и композициях, представленных в данном документе, предпочтительно нацеливаются на РНК (первичные или процессированные) гена-мишени AGT. Можно получать композиции и осуществлять способы для подавления экспрессии

данных генов с использованием иРНК, как это описано в данном документе.

Введение иРНК в соответствии со способами по настоящему изобретению может приводить к предупреждению или лечению нарушения, ассоциированного с АГТ, например высокого кровяного давления, например гипертензии. Ниже приведены диагностические критерии для различных типов высокого кровяного давления.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, как, например, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг.

Предпочтительно иРНК вводят подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Для доставки требуемой дозы иРНК субъекту можно использовать одну или несколько инъекций. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени.

Введение можно повторять на регулярной основе. В определенных вариантах осуществления после начальной схемы лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Схема с повторным введением доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, как, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. В определенных вариантах осуществления иРНК вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза каждые три месяца или от приблизительно одного раза каждые три месяца до приблизительно одного раза каждые шесть месяцев.

### **VIII. Диагностические критерии, факторы риска и способы лечения гипертензии**

Недавно были пересмотрены практические руководства по предупреждению и лечению гипертензии. Всесторонние отчеты были опубликованы Reboussin *et al.* (Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004.) и Whelton *et al.* (2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006.). Ниже приведены некоторые основные моменты новых руководств. Тем не менее, данные руководства следует понимать как предоставляющие специалистам в данной области техники сведения, касающиеся диагностических критериев и критериев мониторинга и лечения гипертензии на момент подачи настоящей заявки, и они включены в данный документ посредством ссылки.

#### *A. Диагностические критерии*

Хотя имеется постоянная ассоциация между более высоким кровяным давлением и повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, уровни кровяного давления полезно было бы разделить на категории для принятия клинических решений и

решений в области общественного здравоохранения. Кровяное давление можно разделить на 4 уровня на основе среднего кровяного давления, измеренного в медицинском учреждении (показатели давления в медицинском кабинете): нормальное, повышенное и гипертензия 1 или 2 стадии, как показано в представленной ниже таблице (из Whelton *et al.*, 2017).

Категория кровяного давления	Систолическое кровяное давление		Диастолическое кровяное давление
Нормальное	<120 мм рт. ст.	и	<80 мм рт. ст.
Повышенное	120-129 мм рт. ст.	и	<80 мм рт. ст.
<b>Гипертензия*</b>			
1 стадия	130-139 мм рт. ст.	или	80-89 мм рт. ст.
2 стадия	>140 мм рт. ст.	или	> 90 мм рт. ст.

\*Индивидуумов с систолическим кровяным давлением и диастолическим кровяным давлением в 2 категориях следует относить к категории более высокого кровяного давления.

Кровяное давление указывает на кровяное давление на основании в среднем  $\geq 2$  точных показаний, полученных в  $\geq 2$  случаях. Практически рекомендации по получению точных показаний кровяного давления подробно описаны в Whelton *et al.*, 2017 и известны в данной области техники.

Данное разделение на категории отличается от того, которое было рекомендовано ранее в отчете JNC 7 (Chobanian *et al.*; the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003;42:1206-52), при этом гипертензию 1 стадии теперь определяют как систолическое кровяное давление (SBP), составляющее 130-139, или диастолическое кровяное давление (DBP), составляющее 80-89 мм рт. ст., а гипертензия 2 стадии в настоящем документе соответствует 1 и 2 стадиям в отчете JNC 7. Обоснование для данного разделения на категории основано на данных наблюдений, связанных с установлением ассоциации между SBP/DBP и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, по результатам рандомизированных клинических испытаний по изменению образа жизни для снижения кровяного давления и рандомизированных клинических испытаний по лечению гипотензивными лекарственными препаратами для предупреждения сердечно-сосудистых заболеваний.

Точно установлен повышенном риске развития сердечно-сосудистого заболевания у взрослых людей с гипертензией 2 стадии. Все в большем количестве отдельных исследований и метаанализах данных наблюдений сообщается, что наблюдается градиент постепенного повышения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний при переходе от нормального кровяного давления к повышенному кровяному давлению и гипертензии 1 стадии. Во многих из этих метаанализов относительный риск развития ишемической болезни сердца и инсульта составлял от 1,1 до 1,5 при сравнении SBP/DBP 120-129/80-84

мм рт. ст. и <120/80 мм рт. ст. и от 1,5 и 2,0 при сравнении SBP/DBP 130-139/85-89 мм рт. ст. и <120/80 мм рт. ст. Этот градиент риска был постоянным для всех подгрупп, определяемых по полу и расе/этнической принадлежности. Относительное увеличение риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, ассоциированного с повышенным кровяным давлением, было выражено слабее, но все еще присутствовало у пожилых людей. Индивидуумам с повышенным кровяным давлением и гипертензией 1 и 2 стадии рекомендовано изменение образа жизни и фармакологическое гипотензивное лечение. Даже если в результате лечения кровяное давление не нормализуется, клиническую пользу можно получать в виде уменьшения стадии повышенного кровяного давления.

### *В. Факторы риска*

Гипертензия представляет собой сложное заболевание, которое возникает в результате комбинации факторов, в том числе без ограничения генетики, образа жизни, рациона и вторичных факторов риска. Гипертензия также может быть ассоциирована с беременностью. Понятно, что вследствие сложной природы гипертензии для лечения гипертензии могут потребоваться множественные вмешательства. Более того, для предупреждения и лечения гипертензии могут быть применимы нефармакологические вмешательства, в том числе изменение рациона и образа жизни. Кроме того, вмешательство может принести клиническую пользу и без полной нормализации кровяного давления у человека.

#### 1. Генетические факторы риска

Были идентифицированы несколько моногенных форм гипертензии, такие как поддающийся лечению глюкокортикоидами альдостеронизм, синдром Лиддла, синдром Гордона и другие, при которых мутации в одном гене полностью объясняют патофизиологию гипертензии, при этом такие нарушения являются редкими. Текущая классификация известных генетических вариантов, вносящих вклад в повышение кровяного давления и развитие гипертензии, включает больше 25 редких мутаций и 120 однонуклеотидных полиморфизмов. Однако, несмотря на то, что генетические факторы могут вносить вклад в развитие гипертензии у некоторых индивидуумов, согласно оценкам генетические варианты служат причиной только приблизительно 3,5% изменчивости кровяного давления.

#### 2. Рацион и употребление алкоголя

Общие факторы риска, обусловленные условиями и образом жизни, ведущие к развитию гипертензии, включают неправильный рацион, недостаточную физическую активность и чрезмерное употребление алкоголя. Эти факторы могут приводить к развитию у человека избыточного веса или ожирения, что дополнительно увеличивает вероятность развития или обострения гипертензии. Повышенное кровяное давление даже сильнее коррелирует с увеличением соотношения окружности талии и окружности бедер или другими показателями центрального распределения жира. Ожирение в молодом возрасте и продолжающееся ожирение сильно коррелируют с гипертензией в более позднем возрасте. Достижение нормального веса может снизить риск развития высокого кровяного давления

до такого, который наблюдается у человека, который никогда не страдал ожирением.

Поступление в организм натрия, калия, магния и кальция также может оказать значительный эффект на кровяное давление. Поступление в организм натрия положительно коррелирует с кровяным давлением и большей частью служит причиной возрастного повышения кровяного давления. Определенные группы людей являются более чувствительными к повышенному потреблению натрия, чем другие группы, в том числе представители негроидной расы и пожилые люди (возрастом > 65 лет), а также люди с более высоким уровнем кровяного давления или сопутствующими заболеваниями, такими как хроническое заболевание почек, сахарный диабет или метаболический синдром. В совокупности эти группы составляют более половины всего взрослого населения США. Солечувствительность может быть маркером повышения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и общей смертности, независимо от кровяного давления. В настоящее время методики распознавания солечувствительности не применяются на практике в клинических условиях. Следовательно, солечувствительность лучше всего рассматривать как характеристику группы людей.

Поступление в организм калия проявляет обратную зависимость с кровяным давлением и инсультом, и более высокий уровень калия, по-видимому, притупляет эффект натрия на кровяное давление. Более низкое соотношение натрия и калию ассоциировано с более низким кровяным давлением, чем давление, которое отмечается при соответствующих уровнях натрия или калия самих по себе. Аналогичное наблюдение было сделано для риска развития сердечно-сосудистого заболевания.

Употребление алкоголя было давно ассоциировано с высоким кровяным давлением. Согласно полученным оценкам, в США употребление алкоголя служит причиной заболеваемости гипертонией у приблизительно 10% населения, причем показатель заболеваемости больше у мужчин, чем у женщин.

Понятно, что изменения в рационе или употреблении алкоголя могут быть аспектом предупреждения развития или лечения гипертонии.

### 3. Физическая активность

Существует четко установленная обратная корреляция между физической активностью/физической формой и уровнями кровяного давления. Было продемонстрировано, что даже умеренные уровни физической активности оказывают благоприятное влияние в виде уменьшения гипертонии.

Понятно, что увеличение физической активности может быть аспектом предупреждения развития или лечения гипертонии.

### 4. Вторичные факторы риска

Вторичная гипертония может лежать в основе сильного повышения кровяного давления, гипертонии, резистентной к фармакологическим препаратам, гипертонии с внезапным началом, повышенного кровяного давления у пациентов с гипертонией, ранее контролируемой медикаментозной терапией, проявления диастолической гипертонии у пожилых людей и поражения целевых органов, несоизмерного с продолжительностью или

тяжестью гипертензии. Хотя вторичную гипертензию следует предполагать у более молодых пациентов (возрастом <30 лет) с повышенным кровяным давлением, при этом нередки случаи того, что первичная гипертензия проявляется в более молодом возрасте, особенно у представителей негроидной расы, а некоторые формы вторичной гипертензии, такие как реноваскулярная болезнь, чаще встречаются в более старшем возрасте (> 65 лет). Многие причины вторичной гипертензии тесно ассоциированы с клиническими проявлениями или группами проявлений, которые позволяют предположить конкретное заболевание. В таких случаях лечение патологического состояния, лежащего в основе, может устранить проявления повышенного кровяного давления без введения средств, как правило, применяемых для лечения гипертензии.

### 5. Беременность

Беременность является фактором риска для высокого кровяного давления, а высокое кровяное давление во время беременности является фактором риска развития сердечно-сосудистого заболевания и гипертензии в более позднем возрасте. Отчет об ассоциированной с беременностью гипертензии был опубликован в 2013 году Американским колледжем акушерства и гинекологии (ACOG) (American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1122-31). Ниже представлены некоторые основные моменты данного отчета. Тем не менее, данный отчет следует понимать как предоставляющий специалистам в данной области техники сведения, касающиеся диагностических критериев и критериев мониторинга и лечения гипертензии при беременности на момент подачи настоящей заявки, и они включены в данный документ посредством ссылки.'

Диагностические критерии для преэклампсии представлены в таблице ниже (на основании таблицы 1 из отчета ACOG, 2013).

<b>Кровяное давление</b>	- диастолическое >140 мм рт. ст. или диастолического >90 мм рт. ст. в двух случаях с интервалом не менее 4 часов после 20 недель беременности у женщины с ранее нормальным кровяным давлением - систолическое >160 мм рт. ст. или диастолическое >110 мм рт. ст., гипертензия может быть подтверждена в пределах короткого интервала (нескольких минут) для своевременной организации гипотензивной терапии
<b>и</b>	
<b>Протеинурия</b>	- >300 мг в образце мочи, собранном на протяжении 24 часов (или данное количество, экстраполированное на образец мочи, собранный за определенное время) или - соотношение белок/креатинин >0,3 (каждое содержание измерено в мг/дл)

<b>или, при отсутствии протеинурии, впервые выявленная гипертензии с впервые выявленным одним из следующего:</b>	
<b>Тромбоцитопения</b>	- количество тромбоцитов < 100000/микролитр
<b>Почечная недостаточность</b>	- Концентрация креатинина в сыворотке крови > 1,1 мг/дл или двукратное увеличение концентрации креатинина в сыворотке крови при отсутствии других заболеваний почек
<b>Нарушенная функция печени</b>	- Повышенные концентрации в крови, в случае печеночных трансаминаз двойное превышение нормальной концентрации
<b>Отек легких</b>	
<b>Мозговые симптомы и симптомы нарушения зрения</b>	

Контроль кровяного давления во время беременности осложняется тем фактом, что многие традиционно применяемые гипотензивные средства, в том числе ингибиторы АСЕ и ARB, противопоказаны во время беременности из-за потенциального вреда для плода. Задача гипотензивного лечения во время беременности включает предупреждение развития тяжелой гипертензии и возможность продления срока беременности для обеспечения плоду большего количества времени для созревания до момента родов. В обзорном исследовании, посвященном лечению тяжелой гипертензии, ассоциированной с беременностью, не было обнаружено достаточного количества доказательств для рекомендации специфических средств; скорее в этих условиях был рекомендован клинический опыт (Duley L, Meher S, Jones L. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. 2013;7:CD001449.).

### *С. Способы лечения*

Лечение высокого кровяного давления является сложным, поскольку оно зачастую сопровождается другими сопутствующими заболеваниями, во многих случаях включающими снижение функции почек, по поводу которого субъект также может проходить лечение. Практикующие врачи, ведущие лечение взрослых с высоким кровяным давлением, должны сосредоточиться на общем состоянии здоровья пациента, уделяя особое внимание снижению риска неблагоприятных исходов сердечно-сосудистых заболеваний в будущем. Все факторы риска у пациента необходимо контролировать комплексно с помощью всестороннего набора нефармакологических и фармакологических стратегий. По мере увеличения кровяного давления и риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в будущем у пациента необходимо усиливать контроль за кровяным давлением.

Несмотря на то, что лечение высокого кровяного давления с помощью снижающих кровяное давление лекарственных препаратов, исходя только из уровня кровяного давления, считается экономически целесообразным, в снижении риска развития сердечно-сосудистого заболевания более эффективным и экономически целесообразным является

использование сочетания абсолютного риска развития сердечно-сосудистого заболевания и уровня кровяного давления в качестве ориентира для такого лечения, чем использование только уровня кровяного давления. Многим пациентам, начавшим лечение одним средством, для достижения целевых значений кровяного давления впоследствии будут требоваться  $\geq 2$  лекарственных средств из разных фармакологических классов. Важны сведения о фармакологических механизмах действия каждого средства. Схемы приема лекарственных средств с комплементарной активностью, в тех случаях, когда второе гипотензивное средство используют для блокирования компенсаторных реакций на исходное средство или воздействия на другой повышающий кровяное давление механизм, могут приводить к аддитивному снижению кровяного давления. Например, тиазидные диуретики могут стимулировать ренин-ангиотензин-альдостероновую систему. При добавлении к тиазиду ингибитора ACE или ARB можно получить аддитивный эффект снижения кровяного давления. Соблюдение предписанной схемы лечения также может улучшать использование комбинированной терапии. Для проведения гипотензивной лекарственной терапии доступны несколько комбинаций лекарственных средств с 2 и 3 фиксированными дозами, при этом компоненты характеризуются комплементарными механизмами действия.

Ниже представлена таблица 18 из Whelton *et al.* 2017, в которой перечислены пероральные гипотензивные лекарственные средства. Представлены классы терапевтических средств для лечения высокого кровяного давления и лекарственные средства, относящиеся к этим классам. Также представлены диапазоны доз, частота приема и комментарии.

Класс	Лекарственное средство	Обычная доза, диапазон (мг/сутки) *	Частота приема в сутки	Комментарии
<b>Основные средства</b>				
Тиазидные диуретики или диуретики тиазидного типа	Хлорталидон	12,5-25	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Хлорталидон является предпочтительным, исходя из пролонгированного периода полувыведения и доказанного в испытаниях снижения CVD.</li> <li>• Отслеживать гипонатриемию и гипокалиемию, уровни мочевой кислоты и кальция.</li> </ul>
	Гидрохлоротиазид	25-50	1	
	Индапамид	1,25-2,5	1	
	Метолазон	2,5-10	1	

				<ul style="list-style-type: none"> <li>• Применять с осторожностью у пациентов с острой подагрой в анамнезе, если только пациент не проходит терапию, снижающую уровень мочевой кислоты.</li> </ul>
Ингибиторы АСЕ	Беназеприл	10-40	1 или 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Не применять в комбинации с ARB или прямым ингибитором ренина</li> <li>• Существует повышенный риск развития гиперкалиемии, особенно у пациентов с СКД или у пациентов, принимающих <math>K^+</math> добавки или <math>K^+</math>-сберегающие лекарственные средства.</li> <li>• Существует риск развития острой почечной недостаточности у пациентов с тяжелым двусторонним стенозом почечной артерии.</li> <li>• Не применять, если у пациента в анамнезе был отек Квинке при использовании ингибиторов АСЕ.</li> <li>• Избегать при беременности.</li> </ul>
	Каптоприл	12,5-150	2 или 3	
	Эналаприл	5-40	1 или 2	
	Фозиноприл	10-40	1	
	Лизиноприл	10-40	1	
	Мозексиприл	7,5-30	1 или 2	
	Периндоприл	4-16	1	
	Хинаприл	10-80	1 или 2	
	Рамиприл	2,5-10	1 или 2	
Трандолаприл	1-4	1		
ARB	Азилсартан	40-80	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Не применять в комбинации с ингибиторами АСЕ или прямыми ингибиторами ренина</li> <li>• Существует повышенный риск развития гиперкалиемии при СКД или у пациентов, принимающих <math>K^+</math> добавки или <math>K^+</math>-сберегающие лекарственные средства.</li> <li>• Существует риск развития острой почечной недостаточности у пациентов с тяжелым</li> </ul>
	Кандесартан	8-32	1	
	Эпросартан	600-800	1 или 2	
	Ирбесартан	150-300	1	
	Лозартан	50-100	1 или 2	
	Олмесартан	20-40	1	
	Телмисартан	20-80	1	
	Валсартан	80-320	1	

				<p>двусторонним стенозом почечной артерии.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Не применять, если у пациента в анамнезе был отек Квинке при использовании ARB. Пациенты с отеком Квинке в анамнезе при приеме ингибитора АСЕ могут принимать ARB, начиная через 6 недель после прекращения приема ингибитора АСЕ.</li> <li>• Избегать при беременности.</li> </ul>
ССВ-дигидропиридины	Амлодипин	2,5-10	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Избегать применения у пациентов с HFrEF; при необходимости можно применять амлодипин или фелодипин</li> <li>• Они ассоциированы с дозозависимым отеком стопы, который чаще встречается у женщин, чем у мужчин.</li> </ul>
	Фелодипин	5-10	1	
	Исрадипин	5-10	2	
	Никардипин SR	5-20	1	
	Нифедипин LA	60-120	1	
	Нисолдипин	30-90	1	
ССВ, не относящиеся к дигидропиридинам	Дилтиазем SR	180-360	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Избегать повседневного применения бета-блокаторов из-за повышенного риска развития брадикардии и блокады сердца.</li> <li>• Не применять у пациентов с HFrEF.</li> <li>• Наблюдается межлекарственные взаимодействия с дилтиаземом и верапамилем (основной субстрат и умеренный ингибитор CYP3A4).</li> </ul>
	Дилтиазем ER	120-480	1	
	Верапамил IR	40-80	3	
	Верапамил SR	120-480	1 или 2	
	Верапамил с отложенным началом действия ER (различные формы)	100-480	1 (вечером)	
<b>Вторичные средства</b>				
Петлевые диуретики	Буметанид	0,5-4	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Являются предпочтительными диуретиками у пациентов с симптоматической HF. Они предпочтительнее тиазидов у пациентов с умеренной - тяжелой степенью СКД (например, GFR &lt;30 мл/мин)</li> </ul>
	Фуросемид	20-80	2	
	Торсемид	5-10	1	

Калийсберегающие диуретики	Амилорид	5-10	1 или 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Являются средствами монотерапии и минимально эффективными гипотензивными средствами.</li> <li>• Комбинированную терапию из калийсберегающего диуретика с тиазидом можно рассматривать для пациентов с гипокалиемией при монотерапию тиазидами.</li> <li>• Избегать у пациентов с выраженной СКД (например, GFR &lt;45 мл/мин).</li> </ul>
	Триамтерен	50-100	1 или 2	
Диуретики - антагонисты альдостерона	Эплеренон	50-100	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Являются предпочтительными средствами при первичном альдостеронизме и резистентной гипертензии.</li> <li>• Спиринолактон ассоциирован с большим риском развития гинекомастии и импотенции по сравнению с эплереноном.</li> <li>• Эта стандартная дополнительная терапия при резистентной гипертензии.</li> <li>• Избегать применения с K<sup>+</sup> добавками, другими K<sup>+</sup>-сберегающими диуретиками или при выраженном нарушении функции почек.</li> <li>• Для надлежащего снижения ВР эплеренон зачастую необходимо принимать дважды в сутки</li> </ul>
	Спиринолактон	25-100	1	
Бета-блокаторы кардиоселективного	Атенолол	25-100	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Бета-блокаторы не рекомендуются в качестве лекарственных средств первой линии</li> </ul>
	Бетаксоллол	5-20	1	
	Бисопролол	2,5-10	1	

действия	Метопролола тартрат	100-400	2	терапии, если у пациента нет ИHD или HF. • Они предпочтительны для пациентов с бронхоспастическим заболеванием дыхательных путей, при котором необходим прием бета-блокатора. • Бисопролол и метопролола сукцинат предпочтительны для пациентов с HFrEF. • Избегать резкого прекращения приема препарата.
	Метопролола сукцинат	50-200	1	
Бета-блокаторы кардиоселективного и сосудорасширяющего действия	Небиволол	5-40	1	• Невиволол индуцирует вазодилатацию, индуцируемую оксидом азота. • Избегать резкого прекращения приема препарата.
Бета-блокаторы некардиоселективного действия	Надолол	40-120	1	• Избегать применения у пациентов с реактивным заболеванием дыхательных путей • Избегать резкого прекращения приема препарата.
	Пропранолол IR	160-480	2	
	Пропранолол LA	80-320	1	
Бета-блокаторы с собственной симпатомиметической активностью	Ацебутолол	200-800	2	• В целом следует избегать применения, особенно у пациентов с ИHD или HF. • Избегать резкого прекращения приема препарата.
	Картеолол	2,5-10	1	
	Пенбутолол	10-40	1	
	Пиндолол	10-60	2	
Комбинированные бета-блокаторы альфа- и бета-рецепторов	Карведилол	12,5-50	2	• Карведилол является предпочтительным для пациентов с HFrEF. • Избегать резкого прекращения приема препарата.
	Карведилола фосфат	20-80	1	
	Лабеталол	200-800	2	
Прямой ингибитор ренина	Алискирен	150-300	1	• Не применять в комбинации с ингибиторами ACE или ARB • Алискирен обладает очень длительным

				<p>действием.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Существует повышенный риск развития гиперкалиемии при СКД или у пациентов, принимающих <math>K^+</math> добавки или <math>K^+</math>-сберегающие лекарственные средства.</li> <li>• Алискирен может вызывать острую почечную недостаточность у пациентов с тяжелым двусторонним стенозом почечной артерии.</li> <li>• Избегать при беременности.</li> </ul>
Альфа-1-блокаторы	Доксазозин	1-8	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ассоциированы с ортостатической гипотензией, особенно у пожилых людей.</li> <li>• Можно рассматривать как средство второй линии терапии у пациентов с сопутствующей ВРН.</li> </ul>
	Празосин	2-20	2 или 3	
	Теразозин	1-20	1 или 2	
Центральный альфа <sub>1</sub> -агонист и другие лекарственные средства центрального действия	Пероральный клонидин	0,1-0,8	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Их обычно резервируют как терапию последней линии из-за значительных побочных эффектов со стороны ЦНС, особенно у пожилых людей.</li> <li>• Избегать резкого прекращения приема клонидина, что может вызвать гипертензивный криз; дозу клонидина необходимо снижать постепенно, чтобы избежать развития "рикошетной" гипертензии.</li> </ul>
	Клонидиновый пластырь	0,1-0,3	1 раз в неделю	
	Метилдопа	250-1000	2	
	Гуанфацин	0,5-2	1	
Прямые	Гидралазин	250-200	2 или 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ассоциированы с</li> </ul>

вазодилата торы	Миноксидил	5-100	1-3	<p>удержанием натрия и воды и рефлексорной тахикардией; применять с диуретиком и бета-блокатором.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Более высокие дозы гидралазина ассоциированы с синдромом, подобным лекарственной волчанке.</li> <li>• Миноксидил ассоциирован с гирсутизмом и требуется применение петлевого диуретика. Миноксидил может индуцировать перикардиальный выпот.</li> </ul>
--------------------	------------	-------	-----	--

\*Дозы могут отличаться от доз, перечисленных в информации по лекарственному препарату, утвержденной FDA (доступна по ссылке <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/>). ACE обозначает ангиотензин-превращающий фермент; ARB - блокатор рецепторов ангиотензина; BP - кровяное давление; BPH - доброкачественная гиперплазия предстательной железы; CCB - блокатор кальциевых каналов; СКД - хроническая болезнь почек; ЦНС - центральная нервная система; CVD - сердечно-сосудистое заболевание; ER - продленное высвобождение; GFR - скорость клубочковой фильтрации; HF - сердечная недостаточность; HF<sub>r</sub>EF - сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса; ИHD - ишемическая болезнь сердца; IR - немедленное высвобождение; LA - длительное действие и SR - замедленное высвобождение.

По Chobanian *et al.* (2003) The JNC 7 Report. *JAMA* 289(19):2560.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие. Полное содержание всех источников, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых на протяжении настоящей заявки, а также перечня последовательностей настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

## ПРИМЕРЫ

Пример 1. Синтез онРНК

### *Источники реагентов*

В тех случаях, когда источник реагента специально не приводится в данном документе, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартными качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

### *Разработка онРНК*

Набор онРНК, нацеливающихся на ген AGT человека (человек: ID эталонной последовательности в NCBI NM\_000029.3; ID гена в NCBI: 183), разрабатывали с помощью специальных скриптов на языках R и Python. Длина версии 3 эталонной последовательности

мРНК человека NM\_000029 составляет 2587 оснований.

Подробный перечень немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой нити против AGT показан в таблице 3. Подробный перечень модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой нити AGT показан в таблице 5.

#### *Синтез онРНК*

онРНК синтезировали и гибридизировали с помощью стандартных способов, известных в данной области техники.

#### **Пример 2. Способы скрининга *in vitro***

##### *Культура клеток и трансфекции в 384-луночных планшетах*

Клетки Her3b (ATCC, Манассас, Вирджиния, США) выращивали до почти полной конфлюэнтности при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной поддерживающей среде Игла (Gibco), дополненной 10% FBS (ATCC), до отделения от планшета за счет обработки трипсином.

Трансфекцию проводили путем добавления 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine РНКиМах на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса онРНК в отдельной лунке в 384-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем к смеси онРНК добавляли пятьдесят мкл полной питательной среды, содержащей 5000 клеток Her3b. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с использованием однократной дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 нМ и 0,1 нМ, а эксперименты для определения эффекта дозы проводили с использованием шестикратных серийных разведений с получением восьми растворов в диапазоне от 10 нМ до 37,5 фМ.

Дополнительные средства на основе дсРНК, нацеливающиеся на мРНК AGT, описаны в публикации согласно РСТ № WO 2015/179724, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

##### *Выделение общей РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS (Invitrogen™, № по кат. 610-12)*

Клетки лизировали в 75 мкл лизирующего/связывающего буфера, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и перемешивали в течение 10 минут на электростатическом встряхивателе. Стадии промывки проводили в автоматическом режиме с помощью Biotek EL406 с использованием магнитного держателя для планшетов. Гранулы промывали (в 90 мкл) однократно буфером А, однократно буфером В и двукратно буфером Е со стадиями аспирации между промывками. После заключительной аспирации в каждую лунку добавляли 10 мкл полной смеси для РТ, как описано ниже.

##### *Синтез кДНК с использованием набора для высокоэффективной обратной транскрипции кДНК ABI (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, США, № кат. 4368813)*

В каждую лунку добавляли мастер-микс, содержащий 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X

dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию. Планшеты запечатывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом встряхивателе, а затем инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80°C в течение 8 минут.

*ПЦР в режиме реального времени*

К мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (4326317E), 0,5 мкл AGT человека (Hs00174854m1), 2 мкл воды без нуклеаз и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001), добавляли два мкл кДНК. ПЦР в режиме реального времени осуществляли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche).

Для расчета относительного кратного изменения данные анализировали с использованием способа  $\Delta\Delta C_t$  и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955, или клетками с имитацией трансфекции. Значения IC<sub>50</sub> рассчитывали с применением модели аппроксимации по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали относительно клеток, трансфицированных с помощью AD-1955, или клеток с имитацией трансфекции. Последовательности смысловой и антисмысловой нити AD-1955 являются следующими: смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:19) и антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 20). Результаты скрининга показаны в таблице 4.

**Таблица 2.** Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимосвязаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3`-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3`-фосфотиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3`-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3`-фосфат

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол (Нур-(GalNAc-алкил)3)
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (2'-ОМе-фураноза с удаленным азотистым основанием)
Y44	инвертированный нуклеотид ДНК с удаленным азотистым основанием (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	аденозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	цитидин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	гуанозин-гликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
P	фосфат
VP	винилфосфат
(Aam)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфотиоат

<b>Сокращение</b>	<b>Нуклеотид(-ы)</b>
(Gam)	2'-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфотиоат
(Tam)	2'-O-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-O-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфотиоат
dA	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксиаденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-дезоксуридин
dUs	2'-дезоксуридин-3'-фосфотиоат
(Aeo)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-O-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-O-метилксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-O-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-O-метилксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-O-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-O-метилксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-O-метилуридин-2'-фосфат
U3mx)	3'-O-метилксилофуранозилуридин-2'-фосфат
(m5Cam)	2'-O-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-O-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(Chd)	2'-O-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-O-гексадецилцитидин-3'-фосфотиоат
(Uhd)	2'-O-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-O-гексадецилуридин-3'-фосфотиоат
(pshe)	гидроксиэтилфосфотиоат

**Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нити средств на основе дсРНК против AGT**

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_00002 9.3	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_00002 9.3
AD-84704	A-168477	CACAAUGAGAGUACCU GUGAA	21	644-664	A-168478	UUCACAGGUACU CUCAUUGUGGA	205	642-664
AD-84705	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCU UCUAA	22	2076-2096	A-168480	UUAGAAGAAAAG GUGGGAGACUG	206	2074-2096
AD-84706	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACU CCCUA	23	1586-1606	A-168482	UAGGGAGUUUUG CUGGAAAGUGA	207	1584-1606
AD-84707	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAG AAACU	24	1603-1623	A-168484	AGUUUCUUCAUC CAGUUGAGGGA	208	1601-1623
AD-84708	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAU GAUCAA	25	1889-1909	A-168486	UUGAUCAUACAC AGCAAACAGGA	209	1887-1909
AD-84709	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAU CAAAGA	26	1892-1912	A-168488	UCUUUGAUCAUA CACAGCAAACA	210	1890-1912
AD-84710	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUG UGAAA	27	2283-2303	A-168490	UUUCACAAACAA GCUGGUCGGUU	211	2281-2303
AD-84711	A-168491	UCCAACCGACCAGCUU GUUUA	28	2278-2298	A-168492	UAAACAAGCUGG UCGGUUGGAAU	212	2276-2298
AD-84712	A-168493	CCAUUCUGUUUGCUG UGUAU	29	1883-1903	A-168494	AUACACAGCAAA CAGGAAUGGGC	213	1881-1903
AD-	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAU	30	2082-2102	A-168496	UACUCAUUAGAA	214	2080-2102

84713		GAGUA				GAAAAGGUGGG		
AD-84714	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGA UCAAAA	31	1891-1911	A-168498	UUUUGAUCAUAC ACAGCAAACAG	215	1889-1911
AD-84715	A-168499	GCUGAGAAGAUUGAC AGGUUA	32	1250-1270	A-168500	UAACCUGUCAAU CUUCUCAGCAG	216	1248-1270
AD-84716	A-168501	UCCAGCAAAACUCCC UCAAA	33	1589-1609	A-168502	UUUGAGGGAGUU UUGCUGGAAAG	217	1587-1609
AD-84717	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGA CAGGUU	34	1249-1269	A-168504	AACCUGUCAAU UUCUCAGCAGC	218	1247-1269
AD-84718	A-168505	UCUCACUUCCAGCAA AACUA	35	1582-1602	A-168506	UAGUUUUGCUGG AAAGUGAGACC	219	1580-1602
AD-84719	A-168507	UCCACAAUGAGAGUAC CUGUA	36	642-662	A-168508	UACAGGUACUCU CAUUGUGGAUG	220	640-662
AD-84720	A-168509	CCACCUCGUCAUCCAC AAUGA	37	631-651	A-168510	UCAUUGUGGAUG ACGAGGUGGAA	221	629-651
AD-84721	A-168511	UCACUUCCAGCAAAA CUCCA	38	1584-1604	A-168512	UGGAGUUUUGCU GGAAAGUGAGA	222	1582-1604
AD-84722	A-168513	UCCUCAACUGGAUGA AGAAA	39	1601-1621	A-168514	UUUCUUCAUCCA GUUGAGGGAGU	223	1599-1621
AD-84723	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGC AGCUA	40	650-670	A-168516	UAGCUGCUCACA GGUACUCUCAU	224	648-670
AD-84724	A-168517	AGAAUCCAACCGACC AGCUU	41	2273-2293	A-168518	AAGCUGGUCGGU UGGAAUUCUUU	225	2271-2293
AD-84725	A-168519	CAUCCUGUUUGCUGU GUAUA	42	1884-1904	A-168520	UAUACACAGCAA ACAGGAAUGGG	226	1882-1904
AD-	A-168521	GAAUCCAACCGACCA	43	2274-2294	A-168522	UAAGCUGGUCGG	227	2272-2294

84726		GCUUA				UUGGAAUUCUU		
AD-84727	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGU ACCUA	44	640-660	A-168524	UAGGUACUCUCA UUGUGGAUGAC	228	638-660
AD-84728	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCU GUGUA	45	1882-1902	A-168526	UACACAGCAAAC AGGAAUGGGCG	229	1880-1902
AD-84729	A-168527	CUGGGUUUAUUUAG AGAAUA	46	2202-2222	A-168528	UAUUCUCUAAAA UAAACCCAGCA	230	2200-2222
AD-84730	A-168529	GCUGGGUUUAUUUA GAGAAU	47	2201-2221	A-168530	AUUCUCUAAAAU AAACCCAGCAA	231	2199-2221
AD-84731	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGA GCUAU	48	861-881	A-168532	AUAGCUCACUGU GCAUGCCAUAU	232	859-881
AD-84732	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAG UCUAA	49	1816-1836	A-168534	UUAGACUCUGUG GGCUCUCUCUC	233	1814-1836
AD-84733	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUU AGCGA	50	2234-2254	A-168536	UCGCUAAACACU GGUUCUUGCCU	234	2232-2254
AD-84734	A-168537	CCAGCAAACUCCCUC AACUA	51	1591-1611	A-168538	UAGUUGAGGGAG UUUUGCUGGAA	235	1589-1611
AD-84735	A-168539	CACCUCGUCAUCCACA AUGAA	52	632-652	A-168540	UUCAUUGUGGAU GACGAGGUGGA	236	630-652
AD-84736	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAG AGUAA	53	637-657	A-168542	UUACUCUCAUUG UGGAUGACGAG	237	635-657
AD-84737	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGG ACUUA	54	1211-1231	A-168544	UAAGUCCAGAGA GCGUGGGAGGA	238	1209-1231
AD-84738	A-168545	AACUCCCUCAACUGGA UGAAA	55	1598-1618	A-168546	UUUCAUCCAGUU GAGGGAGUUUU	239	1596-1618
AD-	A-168547	UGAGAAGAUUGACAG	56	1252-1272	A-168548	AUGAACCUGUCA	240	1250-1272

84739		GUUCAU				AUCUUCUCAGC		
AD-84740	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAU GAGAA	57	634-654	A-168550	UUCUCAUUGUGG AUGACGAGGUG	241	632-654
AD-84741	A-168551	GAGAAGAUUGACAGG UUCAUA	58	1253-1273	A-168552	UAUGAACCGUC AAUCUUCUCAG	242	1251-1273
AD-84742	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGU AUAUA	59	841-861	A-168554	UAUAUACGGAAG CCAAGAAGUU	243	839-861
AD-84743	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCA CAAUA	60	630-650	A-168556	UAUUGUGGAUGA CGAGGUGGAAG	244	628-650
AD-84744	A-168557	AGAUUGACAGGUUCA UGCAGA	61	1257-1277	A-168558	UCUGCAUGAACC UGUCAAUUCUUC	245	1255-1277
AD-84745	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUG AAGAA	62	1600-1620	A-168560	UUCUUCAUCCAG UUGAGGGAGUU	246	1598-1620
AD-84746	A-168561	AAUGAGAGUACCUGU GAGCAA	63	647-667	A-168562	UUGCUCACAGGU ACUCUCAUUGU	247	645-667
AD-85431	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAA UGAGU	64	2081-2101	A-170464	ACUCAUUAGAAG AAAAGGUGGGA	248	2079-2101
AD-85432	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGU GAAAA	65	2284-2304	A-170465	UUUUCACAAACA AGCUGGUCGGU	249	2282-2304
AD-85433	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUG AGUCA	66	2083-2103	A-170466	UGACUCAUUAGA AGAAAAGGUGG	250	2081-2103
AD-85434	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGA GUACA	67	638-658	A-170467	UGUACUCUCAUU GUGGAUGACGA	251	636-658
AD-85435	A-168477	CACAAUGAGAGUACCU GUGAA	68	644-664	A-170468	UUCACAGGUACU CUCAUUGUGGA	252	642-664
AD-	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCU	69	2076-2096	A-170469	UUAGAAGAAAAG	253	2074-2096

85436		UCUAA				GUGGGAGACUG		
AD-85437	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACU CCCUA	70	1586-1606	A-170470	UAGGGAGUUUUG CUGGAAAGUGA	254	1584-1606
AD-85438	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAG AAACU	71	1603-1623	A-170471	AGUUUCUUCAUC CAGUUGAGGGA	255	1601-1623
AD-85439	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAU GAUCAA	72	1889-1909	A-170472	UUGAUCAUACAC AGCAAACAGGA	256	1887-1909
AD-85440	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAU CAAAGA	73	1892-1912	A-170473	UCUUUGAUCAUA CACAGCAAACA	257	1890-1912
AD-85441	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUG UGAAA	74	2283-2303	A-170474	UUUCACAAACAA GCUGGUCGGUU	258	2281-2303
AD-85442	A-168491	UCCAACCGACCAGCUU GUUUA	75	2278-2298	A-170475	UAAACAAGCUGG UCGGUUGGAAU	259	2276-2298
AD-85443	A-168493	CCAUUCUGUUUGCUG UGUAU	76	1883-1903	A-170476	AUACACAGCAAA CAGGAAUGGGC	260	1881-1903
AD-85444	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAU GAGUA	77	2082-2102	A-170477	UACUCAUUAGAA GAAAAGGUGGG	261	2080-2102
AD-85445	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGA UCAAAA	78	1891-1911	A-170478	UUUUGAUCAUAC ACAGCAAACAG	262	1889-1911
AD-85446	A-168499	GCUGAGAAGAUUGAC AGGUUA	79	1250-1270	A-170479	UAACCUGUCAAU CUUCUCAGCAG	263	1248-1270
AD-85447	A-168501	UUCAGCAAAACUCCC UCAAA	80	1589-1609	A-170480	UUUGAGGGAGUU UUGCUGGAAAG	264	1587-1609
AD-85448	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGA CAGGUU	81	1249-1269	A-170481	AACCUGUCAAU UUCUCAGCAGC	265	1247-1269
AD-	A-168505	UCUCACUUUCAGCAA	82	1582-1602	A-170482	UAGUUUUGCUGG	266	1580-1602

85449		AACUA				AAAGUGAGACC		
AD-85450	A-168507	UCCACAAUGAGAGUAC CUGUA	83	642-662	A-170483	UACAGGUACUCU CAUUGUGGAUG	267	640-662
AD-85451	A-168509	CCACCUCGUCAUCCAC AAUGA	84	631-651	A-170484	UCAUUGUGGAUG ACGAGGUGGAA	268	629-651
AD-85452	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAA CUCCA	85	1584-1604	A-170485	UGGAGUUUUGCU GGAAAGUGAGA	269	1582-1604
AD-85453	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGA AGAAA	86	1601-1621	A-170486	UUUCUUCAUCCA GUUGAGGGAGU	270	1599-1621
AD-85454	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGC AGCUA	87	650-670	A-170487	UAGCUGCUCACA GGUACUCUCAU	271	648-670
AD-85455	A-168517	AGAAUUCCAACCGACC AGCUU	88	2273-2293	A-170488	AAGCUGGUCGGU UGGAAUUCUUU	272	2271-2293
AD-85456	A-168519	CAUUCCUGUUUGCUGU GUAUA	89	1884-1904	A-170489	UAUACACAGCAA ACAGGAAUGGG	273	1882-1904
AD-85457	A-168521	GAAUUCCAACCGACCA GCUUA	90	2274-2294	A-170490	UAAGCUGGUCGG UUGGAAUUCUU	274	2272-2294
AD-85458	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGU ACCUA	91	640-660	A-170491	UAGGUACUCUCA UUGUGGAUGAC	275	638-660
AD-85459	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCU GUGUA	92	1882-1902	A-170492	UACACAGCAAAC AGGAAUGGGCG	276	1880-1902
AD-85460	A-168527	CUGGGUUUAUUUAG AGAAUA	93	2202-2222	A-170493	UAUUCUCUAAAA UAAACCAGCA	277	2200-2222
AD-85461	A-168529	GCUGGGUUUAUUUA GAGAAU	94	2201-2221	A-170494	AUUCUCUAAAAU AAACCAGCAA	278	2199-2221
AD-	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGA	95	861-881	A-170495	AUAGCUCACUGU	279	859-881

85462		GCUAU				GCAUGCCAUAU		
AD-85463	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAG UCUAA	96	1816-1836	A-170496	UUAGACUCUGUG GGCUCUCUCUC	280	1814-1836
AD-85464	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUU AGCGA	97	2234-2254	A-170497	UCGCUAAACACU GGUUCUUGCCU	281	2232-2254
AD-85465	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUC AACUA	98	1591-1611	A-170498	UAGUUGAGGGAG UUUUGCUGGAA	282	1589-1611
AD-85466	A-168539	CACCUCGUCAUCCACA AUGAA	99	632-652	A-170499	UUCAUUGUGGAU GACGAGGUGGA	283	630-652
AD-85467	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAG AGUAA	100	637-657	A-170500	UUACUCUCAUUG UGGAUGACGAG	284	635-657
AD-85468	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGG ACUUA	101	1211-1231	A-170501	UAAGUCCAGAGA GCGUGGGAGGA	285	1209-1231
AD-85469	A-168545	AACUCCCUCAACUGGA UGAAA	102	1598-1618	A-170502	UUUCAUCCAGUU GAGGGAGUUUU	286	1596-1618
AD-85470	A-168547	UGAGAAGAUUGACAG GUUCAU	103	1252-1272	A-170503	AUGAACCUGUCA AUCUUCUCAGC	287	1250-1272
AD-85471	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAU GAGAA	104	634-654	A-170504	UUCUCAUUGUGG AUGACGAGGUG	288	632-654
AD-85472	A-168551	GAGAAGAUUGACAGG UUCAUA	105	1253-1273	A-170505	UAUGAACCUGUC AAUCUUCUCAG	289	1251-1273
AD-85473	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGU AUAUA	106	841-861	A-170506	UAUAUACGGAAG CCCAAGAAGUU	290	839-861
AD-85474	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCA CAAUA	107	630-650	A-170507	UAUUGUGGAUGA CGAGGUGGAAG	291	628-650
AD-	A-168557	AGAUUGACAGGUUCA	108	1257-1277	A-170508	UCUGCAUGAACC	292	1255-1277

85475		UGCAGA				UGUCAUUCUUC		
AD-85476	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUG AAGAA	109	1600-1620	A-170509	UUCUUCAUCCAG UUGAGGGAGUU	293	1598-1620
AD-85477	A-168561	AAUGAGAGUACCUGU GAGCAA	110	647-667	A-170510	UUGCUCACAGGU ACUCUCAUUGU	294	645-667
AD-85478	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAA UGAGU	111	2081-2101	A-170511	ACUCAUUAGAAG AAAAGGUGGGA	295	2079-2101
AD-85479	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGU GAAAA	112	2284-2304	A-170512	UUUUCACAAACA AGCUGGUCGGU	296	2282-2304
AD-85480	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUG AGUCA	113	2083-2103	A-170513	UGACUCAUUAGA AGAAAAGGUGG	297	2081-2103
AD-85481	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGA GUACA	114	638-658	A-170514	UGUACUCUCAUU GUGGAUGACGA	298	636-658
AD-85482	A-168477	CACAAUGAGAGUACCU GUGAA	115	644-664	A-170515	UUCACAGGUACU CUCAUUGUGGA	299	642-664
AD-85483	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCU UCUAA	116	2076-2096	A-170516	UUAGAAGAAAAG GUGGGAGACUG	300	2074-2096
AD-85484	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACU CCCUA	117	1586-1606	A-170517	UAGGGAGUUUUG CUGGAAAGUGA	301	1584-1606
AD-85485	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAG AAACU	118	1603-1623	A-170518	AGUUUCUUCAUC CAGUUGAGGGA	302	1601-1623
AD-85486	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAU GAUCAA	119	1889-1909	A-170519	UUGAUCAUACAC AGCAAACAGGA	303	1887-1909
AD-85487	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAU CAAAGA	120	1892-1912	A-170520	UCUUUGAUCAUA CACAGCAAACA	304	1890-1912
AD-	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUG	121	2283-2303	A-170521	UUUCACAAACAA	305	2281-2303

85488		UGAAA				GCUGGUCGGUU		
AD-85489	A-168491	UCCAACCGACCAGCUU GUUUA	122	2278-2298	A-170522	UAAACAAGCUGG UCGGUUGGAAU	306	2276-2298
AD-85490	A-168493	CCAUUCUGUUUGCUG UGUAU	123	1883-1903	A-170523	AUACACAGCAAA CAGGAAUGGGC	307	1881-1903
AD-85491	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAU GAGUA	124	2082-2102	A-170524	UACUCAUUAGAA GAAAAGGUGGG	308	2080-2102
AD-85492	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGA UCAAAA	125	1891-1911	A-170525	UUUUGAUCAUAC ACAGCAAACAG	309	1889-1911
AD-85493	A-168499	GCUGAGAAGAUUGAC AGGUUA	126	1250-1270	A-170526	UAACCUGUCAAU CUUCUCAGCAG	310	1248-1270
AD-85494	A-168501	UUC CAGCAAACUCCC UCAAA	127	1589-1609	A-170527	UUUGAGGGAGUU UUGCUGGAAAG	311	1587-1609
AD-85495	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGA CAGGUU	128	1249-1269	A-170528	AACCUGUCAAU UUCUCAGCAGC	312	1247-1269
AD-85496	A-168505	UCUCACUUCCAGCAA AACUA	129	1582-1602	A-170529	UAGUUUUGCUGG AAAGUGAGACC	313	1580-1602
AD-85497	A-168507	UCCACAAUGAGAGUAC CUGUA	130	642-662	A-170530	UACAGGUACUCU CAUUGUGGAUG	314	640-662
AD-85498	A-168509	CCACCUCGUCAUCCAC AAUGA	131	631-651	A-170531	UCAUUGUGGAUG ACGAGGUGGAA	315	629-651
AD-85499	A-168511	UCACUUCCAGCAAAA CUCCA	132	1584-1604	A-170532	UGGAGUUUUGCU GGAAAGUGAGA	316	1582-1604
AD-85500	A-168513	UCCUCAACUGGAUGA AGAAA	133	1601-1621	A-170533	UUUCUUCAUCCA GUUGAGGGAGU	317	1599-1621
AD-	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGC	134	650-670	A-170534	UAGCUGCUCACA	318	648-670

85501		AGCUA				GGUACUCUCAU		
AD-85502	A-168517	AGAAUCCAACCGACC AGCUU	135	2273-2293	A-170535	AAGCUGGUCGGU UGGAAUUCUUU	319	2271-2293
AD-85503	A-168519	CAUCCUGUUUGCUGU GUAUA	136	1884-1904	A-170536	UAUACACAGCAA ACAGGAAUGGG	320	1882-1904
AD-85504	A-168521	GAAUCCAACCGACCA GCUUA	137	2274-2294	A-170537	UAAGCUGGUCGG UUGGAAUUCUU	321	2272-2294
AD-85505	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGU ACCUA	138	640-660	A-170538	UAGGUACUCUCA UUGUGGAUGAC	322	638-660
AD-85506	A-168525	CCCAUCCUGUUUGCU GUGUA	139	1882-1902	A-170539	UACACAGCAAAC AGGAAUGGGCG	323	1880-1902
AD-85507	A-168527	CUGGGUUUAUUUAG AGAAUA	140	2202-2222	A-170540	UAUUCUCUAAAA UAAACCCAGCA	324	2200-2222
AD-85508	A-168529	GCUGGGUUUAUUUA GAGAAU	141	2201-2221	A-170541	AUUCUCUAAAAU AAACCCAGCAA	325	2199-2221
AD-85509	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGA GCUAU	142	861-881	A-170542	AUAGCUCACUGU GCAUGCCAUAU	326	859-881
AD-85510	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAG UCUAA	143	1816-1836	A-170543	UUAGACUCUGUG GGCUCUCUCUC	327	1814-1836
AD-85511	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUU AGCGA	144	2234-2254	A-170544	UCGCUAAACACU GGUUCUUGCCU	328	2232-2254
AD-85512	A-168537	CCAGCAAACUCCCUC AACUA	145	1591-1611	A-170545	UAGUUGAGGGAG UUUUGCUGGAA	329	1589-1611
AD-85513	A-168539	CACCUCGUCAUCCACA AUGAA	146	632-652	A-170546	UUCAUUGUGGAU GACGAGGUGGA	330	630-652
AD-	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAG	147	637-657	A-170547	UUACUCUCAUUG	331	635-657

85514		AGUAA				UGGAUGACGAG		
AD-85515	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGG ACUUA	148	1211-1231	A-170548	UAAGUCCAGAGA GCGUGGGAGGA	332	1209-1231
AD-85516	A-168545	AACUCCCUCAACUGGA UGAAA	149	1598-1618	A-170549	UUUCAUCCAGUU GAGGGAGUUUU	333	1596-1618
AD-85517	A-168547	UGAGAAGAUUGACAG GUUCAU	150	1252-1272	A-170550	AUGAACCUGUCA AUCUUCUCAGC	334	1250-1272
AD-85518	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAU GAGAA	151	634-654	A-170551	UUCUCAUUGUGG AUGACGAGGUG	335	632-654
AD-85519	A-168551	GAGAAGAUUGACAGG UUCAUA	152	1253-1273	A-170552	UAUGAACCUGUC AAUCUUCUCAG	336	1251-1273
AD-85520	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGU AUUAU	153	841-861	A-170553	UAUAUACGGAAG CCAAGAAGUU	337	839-861
AD-85521	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCA CAAUA	154	630-650	A-170554	UAUUGUGGAUGA CGAGGUGGAAG	338	628-650
AD-85522	A-168557	AGAUUGACAGGUUCA UGCAGA	155	1257-1277	A-170555	UCUGCAUGAACC UGUCAAUUCUUC	339	1255-1277
AD-85523	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUG AAGAA	156	1600-1620	A-170556	UUCUUCAUCCAG UUGAGGGAGUU	340	1598-1620
AD-85524	A-168561	AAUGAGAGUACCUGU GAGCAA	157	647-667	A-170557	UUGCUCACAGGU ACUCUCAUUGU	341	645-667
AD-85619	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAA UGAGU	158	2081-2101	A-170558	ACUCAUUAGAAG AAAAGGUGGGA	342	2079-2101
AD-85620	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGU GAAAA	159	2284-2304	A-170559	UUUUCACAAACA AGCUGGUCGGU	343	2282-2304
AD-	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUG	160	2083-2103	A-170560	UGACUCAUUAGA	344	2081-2103

85621		AGUCA				AGAAAAGGUGG		
AD-85622	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGA GUACA	161	638-658	A-170561	UGUACUCUCAUU GUGGAUGACGA	345	636-658
AD-85623	A-168477	CACAAUGAGAGUACCU GUGAA	162	644-664	A-170562	UUCACAGGUACU CUCAUUGUGGA	346	642-664
AD-85624	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCU UCUAA	163	2076-2096	A-170563	UUAGAAGAAAAG GUGGGAGACUG	347	2074-2096
AD-85625	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACU CCCUA	164	1586-1606	A-170564	UAGGGAGUUUUG CUGGAAAGUGA	348	1584-1606
AD-85626	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAG AAACU	165	1603-1623	A-170565	AGUUUCUUCAUC CAGUUGAGGGA	349	1601-1623
AD-85627	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAU GAUCAA	166	1889-1909	A-170566	UUGAUCAUACAC AGCAAACAGGA	350	1887-1909
AD-85628	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAU CAAAGA	167	1892-1912	A-170567	UCUUUGAUCAUA CACAGCAAACA	351	1890-1912
AD-85629	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUG UGAAA	168	2283-2303	A-170568	UUUCACAAACAA GCUGGUCGGUU	352	2281-2303
AD-85630	A-168491	UCCAACCGACCAGCUU GUUUA	169	2278-2298	A-170569	UAAACAAGCUGG UCGGUUGGAAU	353	2276-2298
AD-85631	A-168493	CCAUUCUGUUUGCUG UGUAU	170	1883-1903	A-170570	AUACACAGCAAA CAGGAAUGGGC	354	1881-1903
AD-85632	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAU GAGUA	171	2082-2102	A-170571	UACUCAUUAGAA GAAAAGGUGGG	355	2080-2102
AD-85633	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGA UCAAAA	172	1891-1911	A-170572	UUUUGAUCAUAC ACAGCAAACAG	356	1889-1911
AD-	A-168499	GCUGAGAAGAUUGAC	173	1250-1270	A-170573	UAACCUGUCAAU	357	1248-1270

85634		AGGUUA				CUUCUCAGCAG		
AD-85635	A-168501	UCCAGCAAACUCCC UCAA	174	1589-1609	A-170574	UUUGAGGGAGUU UUGCUGGAAAG	358	1587-1609
AD-85636	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGA CAGGUU	175	1249-1269	A-170575	AACCUGUCAAUUC UUCUCAGCAGC	359	1247-1269
AD-85637	A-168505	UCUCACUUCCAGCAA AACUA	176	1582-1602	A-170576	UAGUUUUGCUGG AAAGUGAGACC	360	1580-1602
AD-85638	A-168507	UCCACAAUGAGAGUAC CUGUA	177	642-662	A-170577	UACAGGUACUCU CAUUGUGGAUG	361	640-662
AD-85639	A-168509	CCACCUCGUCAUCCAC AAUGA	178	631-651	A-170578	UCAUUGUGGAUG ACGAGGUGGAA	362	629-651
AD-85640	A-168511	UCACUUCCAGCAAAA CUCCA	179	1584-1604	A-170579	UGGAGUUUUGCU GGAAAGUGAGA	363	1582-1604
AD-85641	A-168513	UCCUCAACUGGAUGA AGAAA	180	1601-1621	A-170580	UUUCUUCAUCCA GUUGAGGGAGU	364	1599-1621
AD-85642	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGC AGCUA	181	650-670	A-170581	UAGCUGCUCACA GGUACUCUCAU	365	648-670
AD-85643	A-168517	AGAAUCCAACCGACC AGCUU	182	2273-2293	A-170582	AAGCUGGUCGGU UGGAAUUCUUU	366	2271-2293
AD-85644	A-168519	CAUCCUGUUUGCUGU GUAUA	183	1884-1904	A-170583	UAUACACAGCAA ACAGGAAUGGG	367	1882-1904
AD-85645	A-168521	GAAUCCAACCGACCA GCUUA	184	2274-2294	A-170584	UAAGCUGGUCGG UUGGAAUUCUU	368	2272-2294
AD-85646	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGU ACCUA	185	640-660	A-170585	UAGGUACUCUCA UUGUGGAUGAC	369	638-660
AD-	A-168525	CCCAUCCUGUUUGCU	186	1882-1902	A-170586	UACACAGCAAAC	370	1880-1902

85647		GUGUA				AGGAAUGGGCG		
AD-85648	A-168527	CUGGGUUUAUUUAG AGAAUA	187	2202-2222	A-170587	UAUUCUCUAAAA UAAACCCAGCA	371	2200-2222
AD-85649	A-168529	GCUGGGUUUAUUUA GAGAAU	188	2201-2221	A-170588	AUUCUCUAAAAU AAACCCAGCAA	372	2199-2221
AD-85650	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGA GCUAU	189	861-881	A-170589	AUAGCUCACUGU GCAUGCCAUAU	373	859-881
AD-85651	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAG UCUAA	190	1816-1836	A-170590	UUAGACUCUGUG GGCUCUCUCUC	374	1814-1836
AD-85652	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUU AGCGA	191	2234-2254	A-170591	UCGCUAAACACU GGUUCUUGCCU	375	2232-2254
AD-85653	A-168537	CCAGCAAACUCCCUC AACUA	192	1591-1611	A-170592	UAGUUGAGGGAG UUUUGCUGGAA	376	1589-1611
AD-85654	A-168539	CACCUCGUCAUCCACA AUGAA	193	632-652	A-170593	UUCAUUGUGGAU GACGAGGUGGA	377	630-652
AD-85655	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAG AGUAA	194	637-657	A-170594	UUACUCUCAUUG UGGAUGACGAG	378	635-657
AD-85656	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGG ACUUA	195	1211-1231	A-170595	UAAGUCCAGAGA GCGUGGGAGGA	379	1209-1231
AD-85657	A-168545	AACUCCUCAACUGGA UGAAA	196	1598-1618	A-170596	UUUCAUCCAGUU GAGGGAGUUUU	380	1596-1618
AD-85658	A-168547	UGAGAAGAUUGACAG GUUCAU	197	1252-1272	A-170597	AUGAACCUGUCA AUCUUCUCAGC	381	1250-1272
AD-85659	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAU GAGAA	198	634-654	A-170598	UUCUCAUUGUGG AUGACGAGGUG	382	632-654
AD-	A-168551	GAGAAGAUUGACAGG	199	1253-1273	A-170599	UAUGAACCUGUC	383	1251-1273

85660		UUCAUA				AAUCUUCUCAG		
AD-85661	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGU AUAUA	200	841-861	A-170600	UAUAUACGGAAG CCCAAGAAGUU	384	839-861
AD-85662	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCA CAAUA	201	630-650	A-170601	UAUUGUGGAUGA CGAGGUGGAAG	385	628-650
AD-85663	A-168557	AGAUUGACAGGUUCA UGCAGA	202	1257-1277	A-170602	UCUGCAUGAACC UGUCAUUCUUC	386	1255-1277
AD-85664	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUG AAGAA	203	1600-1620	A-170603	UUCUUCAUCCAG UUGAGGGAGUU	387	1598-1620
AD-85665	A-168561	AAUGAGAGUACCUGU GAGCAA	204	647-667	A-170604	UUGCUCACAGGU ACUCUCAUUGU	388	645-667

**Таблица 4. Скрининг однократной дозы 10 нМ и 0,1 нМ олигонуклеотидов против AGT в клетках Hep3В**

<b>ID дуплекса</b>	<b>10 нМ, среднее значение</b>	<b>10 нМ, SD</b>	<b>0,1 нМ, среднее значение</b>	<b>0,1 нМ, SD</b>
AD-67327	6,2	1,5	30,1	5,9
AD-84700	14,5	5,7	127,9	53,6
AD-84701	8,7	6,5	59,7	5,5
AD-84702	11,4	4,2	95,1	14,6
AD-84703	6,7	4,2	36,7	2,4
AD-84704	7,2	4,3	54,9	5,5
AD-84705	7,8	2,3	52,7	10,3
AD-84706	6,3	4,3	65,0	13,0
AD-84707	10,2	9,2	52,2	2,6
AD-84708	10,1	4,1	98,7	24,6
AD-84709	19,0	4,3	102,7	18,5
AD-84710	11,3	7,9	65,9	19,0
AD-84711	10,4	6,5	66,5	13,8
AD-84712	7,5	6,4	66,4	13,9
AD-84713	9,7	5,9	66,4	5,6
AD-84714	13,7	2,0	89,0	28,9
AD-84715	7,7	5,3	59,0	2,7
AD-84716	7,4	2,4	45,9	15,0
AD-84717	14,6	4,2	102,9	15,8
AD-84718	6,8	0,7	66,9	8,3
AD-84719	21,1	4,0	92,5	19,6
AD-84720	11,3	0,4	96,0	22,1
AD-84721	14,7	5,2	88,4	12,7
AD-84722	35,9	14,8	106,6	21,2
AD-84723	13,4	6,5	83,7	25,9
AD-84724	20,8	6,7	108,0	17,6
AD-84725	17,4	1,2	100,5	22,3
AD-84726	9,7	0,6	73,1	9,0
AD-84727	16,5	5,0	102,4	20,5
AD-84728	17,6	2,6	103,6	12,8
AD-84729	11,6	3,4	78,9	16,1
AD-84730	11,2	1,5	77,6	8,7
AD-84731	11,4	2,9	80,4	15,9
AD-84732	26,9	2,6	88,2	19,5
AD-84733	21,4	2,2	101,5	13,9

AD-84734	20,4	1,9	92,8	20,5
AD-84735	11,4	1,9	85,0	6,0
AD-84736	8,4	2,5	68,0	20,7
AD-84737	22,9	4,0	80,0	13,1
AD-84738	16,0	1,8	98,3	29,5
AD-84739	6,6	2,1	40,5	6,8
AD-84740	10,2	1,8	78,9	32,7
AD-84741	6,3	1,0	37,0	9,7
AD-84742	14,1	2,0	86,9	7,4
AD-84743	80,9	9,9	97,6	16,5
AD-84744	23,1	5,8	93,4	18,9
AD-84745	27,8	5,0	79,2	25,3
AD-84746	7,5	1,2	48,0	14,4
AD-85431	12,3	3,9	61,8	29,6
AD-85432	10,1	6,6	50,5	19,8
AD-85433	11,5	4,0	61,4	25,4
AD-85434	5,8	2,5	37,2	20,4
AD-85435	7,3	1,8	44,9	17,8
AD-85436	8,2	4,9	35,2	12,8
AD-85437	7,2	6,3	30,4	18,6
AD-85438	10,4	7,5	41,8	18,1
AD-85439	15,4	3,8	62,1	25,9
AD-85440	26,1	5,1	85,5	34,7
AD-85441	9,9	7,4	50,6	19,3
AD-85442	8,4	5,2	52,4	20,4
AD-85443	11,5	12,9	59,0	25,0
AD-85444	8,4	4,4	48,6	24,9
AD-85445	21,7	6,8	63,2	36,1
AD-85446	14,7	11,5	59,0	27,5
AD-85447	8,4	2,9	52,8	15,5
AD-85448	12,6	4,0	89,5	25,2
AD-85449	8,3	1,5	72,7	14,2
AD-85450	35,3	6,3	91,4	30,0
AD-85451	17,7	2,3	80,7	20,8
AD-85452	21,5	5,2	73,3	27,4
AD-85453	60,5	32,6	69,0	33,9
AD-85454	21,8	8,6	63,2	23,6
AD-85455	34,0	12,4	88,8	23,4
AD-85456	21,6	1,4	91,9	18,1

AD-85457	12,1	2,6	85,6	28,0
AD-85458	29,8	7,1	98,1	25,4
AD-85459	23,8	2,0	101,2	34,7
AD-85460	9,9	1,8	69,0	12,7
AD-85461	11,0	3,7	60,1	13,4
AD-85462	25,7	4,1	78,5	6,8
AD-85463	56,6	13,1	89,7	20,5
AD-85464	21,8	6,3	99,8	34,4
AD-85465	25,2	6,2	99,2	24,6
AD-85466	35,3	8,4	104,2	31,5
AD-85467	12,7	2,7	82,2	8,4
AD-85468	30,9	6,5	93,0	31,2
AD-85469	44,7	8,0	82,1	13,4
AD-85470	7,9	4,6	66,7	11,2
AD-85471	15,8	3,7	95,3	14,0
AD-85472	9,3	3,3	71,3	15,1
AD-85473	21,5	3,9	102,2	22,4
AD-85474	100,2	24,5	110,4	21,9
AD-85475	28,7	8,6	105,2	31,1
AD-85476	35,5	10,2	81,4	13,1
AD-85477	10,1	2,2	76,9	30,6
AD-85478	15,1	1,9	94,6	27,5
AD-85479	18,7	5,8	92,1	26,6
AD-85480	11,8	4,1	68,8	16,7
AD-85481	5,3	1,1	32,9	8,7
AD-85482	7,1	3,4	52,7	11,5
AD-85483	7,9	3,0	61,1	15,3
AD-85484	11,5	3,3	84,6	8,8
AD-85485	11,6	5,5	58,9	19,7
AD-85486	25,3	6,2	94,8	21,4
AD-85487	40,5	10,2	101,0	24,4
AD-85488	32,8	7,4	97,6	24,2
AD-85489	12,8	4,0	87,2	20,9
AD-85490	7,6	0,8	78,5	20,2
AD-85491	12,5	4,5	92,3	19,0
AD-85492	89,7	17,7	112,3	20,2
AD-85493	6,3	2,6	51,0	14,5
AD-85494	11,0	2,4	79,8	24,0
AD-85495	10,4	2,8	70,1	23,2

AD-85496	6,8	2,2	55,0	20,8
AD-85497	72,4	18,6	108,5	36,5
AD-85498	7,3	2,3	85,3	26,5
AD-85499	94,7	6,8	104,2	24,5
AD-85500	63,1	21,9	98,4	21,4
AD-85501	38,3	12,3	129,0	47,3
AD-85502	27,2	8,3	92,0	21,9
AD-85503	36,2	11,5	108,3	25,4
AD-85504	9,2	3,7	56,1	9,4
AD-85505	50,3	12,2	111,6	15,5
AD-85506	40,8	8,7	109,4	31,6
AD-85507	7,7	2,2	64,3	22,6
AD-85508	82,0	21,9	100,9	29,0
AD-85509	20,9	5,5	101,5	23,0
AD-85510	104,0	28,6	90,1	42,0
AD-85511	14,1	2,6	84,2	9,3
AD-85512	50,6	14,7	98,5	30,7
AD-85513	35,0	9,0	78,5	24,4
AD-85514	13,0	0,9	80,3	27,9
AD-85515	69,1	5,7	72,5	35,1
AD-85516	54,0	16,1	88,4	38,9
AD-85517	7,4	1,3	47,9	7,0
AD-85518	12,0	4,6	79,4	42,4
AD-85519	8,9	2,5	54,6	6,2
AD-85520	10,9	3,0	81,3	19,1
AD-85521	79,1	15,6	108,4	35,4
AD-85522	51,3	10,1	114,7	27,9
AD-85523	23,6	2,9	91,3	26,6
AD-85524	9,9	2,8	46,9	10,8
AD-85619	20,7	1,0	114,4	53,5
AD-85620	20,0	5,8	96,8	25,7
AD-85621	8,9	6,9	80,4	20,3
AD-85622	6,4	3,7	50,2	12,9
AD-85623	7,6	6,0	38,0	4,6
AD-85624	9,2	3,7	81,0	15,9
AD-85625	6,0	2,4	58,9	8,7
AD-85626	7,6	6,3	43,8	3,9
AD-85627	25,5	8,3	103,0	20,0
AD-85628	39,0	7,3	114,5	19,9

AD-85629	23,6	18,5	86,1	14,8
AD-85630	17,2	15,9	83,0	22,5
AD-85631	10,1	6,2	79,0	18,2
AD-85632	10,2	4,3	67,5	10,8
AD-85633	42,1	19,9	95,1	4,5
AD-85634	7,5	2,9	54,6	11,7
AD-85635	8,2	2,6	53,5	24,0
AD-85636	11,4	2,2	96,0	23,7
AD-85637	9,9	5,9	58,2	17,0
AD-85638	53,1	6,2	112	31,1
AD-85639	13,7	2,1	96,9	19,6
AD-85640	72,8	11,7	106,9	7,2
AD-85641	47,2	19,8	89,6	9,5
AD-85642	15,3	3,5	86,7	24,5
AD-85643	35,4	12,9	494,9	779,7
AD-85644	79,0	7,2	110,6	23,5
AD-85645	7,8	1,2	63,6	13,1
AD-85646	33,6	8,6	105,6	28,1
AD-85647	19,4	3,1	102,3	9,7
AD-85648	49,0	6,6	106,0	10,7
AD-85649	18,5	2,9	82,4	10,1
AD-85650	69,4	19,0	87,2	15,6
AD-85651	90,4	17,3	106,9	31,9
AD-85652	31,3	8,5	90,0	37,7
AD-85653	47,6	2,8	104,1	20,6
AD-85654	66,7	3,7	97,5	17,8
AD-85655	10,4	0,8	55,4	6,9
AD-85656	96,7	4,3	98,6	23,4
AD-85657	83,6	3,3	86,6	31,4
AD-85658	7,6	1,8	65,4	9,2
AD-85659	14,1	4,2	76,0	33,0
AD-85660	40,9	6,5	95,8	24,0
AD-85661	63,6	10,4	93,0	34,1
AD-85662	83,4	11,5	87,3	17,2
AD-85663	23,0	5,3	79,1	30,8
AD-85664	44,8	2,9	112,2	19,9
AD-85665	13,5	2,5	81,0	25,4

**Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нити средств на основе дсРНК против hAGTT**

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-84704	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	389	usUfscacAfgGfUfacucUfcAfuugugsgsa	573	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	757
AD-84705	gsuscuccCfaCfCfUfuuuuucuaaL96	390	usUfsagaAfgAfAfaaggUfgGfgagacsusg	574	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	758
AD-84706	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccuaL96	391	usAfsgggAfgUfUfuugcUfgGfaaagusgsa	575	UCACUUUCCAGCAAAACUCCCUC	759
AD-84707	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaacuL96	392	asGfsuuuCfuUfCfauccAfgUfugaggsgsa	576	UCCCUCAACUGGAUGAAGA AACU	760
AD-84708	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaaL96	393	usUfsgauCfaUfAfcacaGfcAfaacagsgsa	577	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	761
AD-84709	ususugcuGfuGfUfAfugaucuaaagaL96	394	usCfsuuuGfaUfCfauacAfcAfgcaaa scsa	578	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	762
AD-84710	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaL96	395	usUfsucaCfaAfAfaagCfuGfgucggsusu	579	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	763
AD-84711	uscscaacCfGfCfCfagcuuguuuuL96	396	usAfsaacAfaGfCfugguCfGfuuuggasasu	580	AUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	764
AD-84712	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	397	asUfsacaCfaGfCfaaacAfgGfaauggsgsc	581	GCCCAUCCUGUUUGCUGUGUAU	765
AD-84713	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL96	398	usAfsucAfuUfAfgaagAfaAfaaggugsgsg	582	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	766
AD-84714	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	399	usUfsuugAfuCfAfuacaCfaGfcaaac	583	CUGUUUGCUGUGUAUGAUC	767

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	L96		sasg		AAAG	
AD-84715	gscsugagAfaGfAfUfugacagguua L96	400	usAfsaccUfgUfCfaaucUfuCfucagc sasg	584	CUGCUGAGAAGAUUGACAG GUUC	768
AD-84716	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL 96	401	usUfsugaGfgGfAfguuuUfgCfugga asasg	585	CUUUCAGCAAAACUCCCU CAAC	769
AD-84717	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguu L96	402	asAfsccuGfuCfAfaucuUfcUfcagca sgsc	586	GCUGCUGAGAAGAUUGACA GGUU	770
AD-84718	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL 96	403	usAfsguuUfuGfCfuggaAfaGfugaga scsc	587	GGUCUCACUUUCAGCAAA ACUC	771
AD-84719	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL 96	404	usAfsccagGfuAfCfucucAfuUfgugga susg	588	CAUCCACAAUGAGAGUACC UGUG	772
AD-84720	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL 96	405	usCfsauuGfuGfGfaugaCfgAfguggg sasa	589	UUCACCUCGUCAUCCACA AUGA	773
AD-84721	uscscacuUfcCfAfGfcaaacuccaL 96	406	usGfsgagUfuUfUfgcugGfaAfaguga sgsa	590	UCUCACUUUCAGCAAAAC UCCC	774
AD-84722	uscscucAfaCfUfGfgaugaagaaaL 96	407	usUfsucuUfcAfUfccagUfuGfaggga sgsu	591	ACUCCUCAACUGGAUGAA GAAA	775
AD-84723	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL 96	408	usAfsccuGfcUfCfacagGfuAfcucuc sasg	592	AUGAGAGUACCUGUGAGCA GCUG	776
AD-84724	asgsaaauCfcAfAfCfcgaccagcuuL 96	409	asAfsccuGfgUfCfugguGfgAfauucu susu	593	AAAGAAUCCAACCGACCA GCUU	777
AD-84725	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguaua L96	410	usAfsuacAfcAfGfcaaaCfaGfgaaug sgsg	594	CCCAUUCUGUUUGCUGUG UAUG	778

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-84726	gsasauucCfaAfCfCfaccagcuuaL96	411	usAfsagcUfgGfUfcgguUfgGfaauuc susu	595	AAGAAUCCAACCGACCAG CUUG	779
AD-84727	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	412	usAfsgggUfcUfCfucauUfgUfggaug sasc	596	GUCAUCCACAAUGAGAGUA CCUG	780
AD-84728	cscsaauCfcUfGfUfuugcuguguaL96	413	usAfsacAfgCfAfaacaGfgAfauggg scsg	597	CGCCAUUCCUGUUUGCUG UGUA	781
AD-84729	csusggguUfuAfUfUfuagagaauaL96	414	usAfsuucUfcUfAfaauAfaAfccag scsa	598	UGCUGGGUUUAUUUUAGAG AAUG	782
AD-84730	gscsuggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	415	asUfsucuCfuAfAfaauAfaCfccages asa	599	UUGCUGGGUUUAUUUUAGA GAAU	783
AD-84731	asusggcaUfgCfAfCfagugacuuaL96	416	asUfsagcUfcAfCfugugCfaUfgccau sasu	600	AUAUGGCAUGCACAGUGAG CUAU	784
AD-84732	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	417	usUfsagaCfuCfUfguggGfcUfcucuc susc	601	GAGAGAGAGCCCACAGAGU CUAC	785
AD-84733	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	418	usCfsgcuAfaAfCfacugGfuUfcuugc scsu	602	AGGCAAGAACCAGUGUUUA GCGC	786
AD-84734	cscsagcaAfaAfCfUfccucaacuaL96	419	usAfsguuGfaGfGfgaguUfuUfgcug gsasa	603	UCCAGCAAACUCCUCA ACUG	787
AD-84735	csasccucGfuCfAfUfccacaugaalL96	420	usUfscauUfgUfGfgaugAfcGfaggug sgsa	604	UCCACCUCGUCAUCCACAA UGAG	788
AD-84736	csgsucuCfcAfCfAfaugagaguaaL96	421	usUfsacuCfuCfAfuuguGfgAfuagc sasg	605	CUCGUCAUCCACAAUGAGA GUAC	789
AD-84737	csuscccaCfcUfCfucuggacuuaL96	422	usAfsaguCfcAfGfagagCfcUfgggag	606	UCCUCCCACGCUCUCUGGA	790

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96		sgsa		CUUC	
AD-84738	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL 96	423	usUfsucaUfcCfAfguugAfgGfgaguu susu	607	AAAACUCCCUCAACUGGAU GAAG	791
AD-84739	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL 96	424	asUfsgaaCfcUfGfucaaUfcUfucucas gsc	608	GCUGAGAAGAUUGACAGGU UCAU	792
AD-84740	cscsucguCfaUfCfCfacaugagaaL 96	425	usUfscucAfuUfGfuggaUfgAfcgagg susg	609	CACCUCGUCAUCCACAAUG AGAG	793
AD-84741	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucaua L96	426	usAfsugaAfcCfUfgucaAfuCfuucuc sasg	610	CUGAGAAGAUUGACAGGUU CAUG	794
AD-84742	csusucuuGfgGfCfUfuccguauua L96	427	usAfsuauAfcGfGfaagcCfcAfagaag susu	611	AACUUCUUGGGCUUCCGUA UAUA	795
AD-84743	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL 96	428	usAfsuugUfgGfAfugacGfaGfgugg asasg	612	CUUCCACCUCGUCAUCCAC AAUG	796
AD-84744	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcaga L96	429	usCfsugcAfuGfAfacuGfuCfaaucu susc	613	GAAGAUUGACAGGUUCAUG CAGG	797
AD-84745	csusccuCfaAfCfUfggauagaagaL 96	430	usUfscuuCfaUfCfcaguUfgAfgggag susu	614	AACUCCCUCAACUGGAUGA AGAA	798
AD-84746	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaL 96	431	usUfsgcuCfaCfAfgguaCfuCfucuu sgsu	615	ACAAUGAGAGUACCUGUGA GCAG	799
AD-85431	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL 96	432	asCfsucauuagaagaAfaAfgguggsgsa	616	UCCACCUUUUCUUCUAAU GAGU	800
AD-85432	csgsaccaGfcUfUfGfuugugaaaaL 96	433	usUfsuucacaaacaaGfcUfggucgsgsu	617	ACCGACCAGCUUGUUUGUG AAAC	801

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85433	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucAL 96	434	usGfsacucauuagaaGfaAfaaggusgsg	618	CCACCUUUUCUUCUAAUGA GUCG	802
AD-85434	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacAL 96	435	usGfsuacucucauugUfgGfaugacsgsa	619	UCGUCAUCCACAAUGAGAG UACC	803
AD-85435	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL 96	436	usUfscacagguacucUfcAfuugugsgsa	620	UCCACAAUGAGAGUACCUG UGAG	804
AD-85436	gsuscuccCfaCfCfUfuuuucuaaL 96	437	usUfsagaagaaaaggUfgGfgagacsusg	621	CAGUCUCCCACCUUUUCUU CUAA	805
AD-85437	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccuaL 96	438	usAfsgggaguuuugcUfgGfaaagusgs a	622	UCACUUUCCAGCAAAACUC CCUC	806
AD-85438	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL 96	439	asGfsuuucuucauccAfgUfugaggsgsa	623	UCCUCAACUGGAUGAAGA AACU	807
AD-85439	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaa L96	440	usUfsgaucuacacaGfcAfaacagsgsa	624	UCCUGUUUGCUGUGUAUGA UCAA	808
AD-85440	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaaga L96	441	usCfsuuugaucuacAfcAfgcaaascsa	625	UGUUUGCUGUGUAUGAUC AAGC	809
AD-85441	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL 96	442	usUfsucacaaacaagCfuGfgucggsusu	626	AACCGACCAGCUUGUUUGU GAAA	810
AD-85442	uscscaacCfGfCfCfagcuuguuuuL 96	443	usAfsaacaagcugguCfgGfuuggasasu	627	AUCCAACCGACCAGCUUG UUUG	811
AD-85443	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguau L96	444	asUfsacacagcaaacAfgGfaauggsgsc	628	GCCCAUCCUGUUUGCUGU GUAU	812
AD-85444	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL	445	usAfscucauuagaagAfaAfaaggugsgsg	629	CCCACCUUUUCUUCUAAUG	813

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96				AGUC	
AD-85445	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaa L96	446	usUfsuugaucauacaCfaGfcaacsasg	630	CUGUUUGCUGUGUAUGAUC AAAG	814
AD-85446	gscsugagAfaGfAfUfugacagguua L96	447	usAfsaccugucaaucUfuCfucagsasg	631	CUGCUGAGAAGAUUGACAG GUUC	815
AD-85447	ususccagCfaAfAfAfcuccucaaaaL 96	448	usUfsugaggaguuUfgCfuggaasas g	632	CUUUCAGCAAAACUCCCU CAAC	816
AD-85448	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguu L96	449	asAfsccugucaaucUfcUfcagcasgsc	633	GCUGCUGAGAAGAUUGACA GGUU	817
AD-85449	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL 96	450	usAfsguuuugcuggaAfaGfugagascsc	634	GGUCUCACUUUCAGCAAA ACUC	818
AD-85450	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL 96	451	usAfsccagguacucucAfuUfuggasusg	635	CAUCCACAAUGAGAGUACC UGUG	819
AD-85451	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL 96	452	usCfsauuguggaugaCfgAfgguggsasa	636	UCCACCUCGUCAUCCACA AUGA	820
AD-85452	uscsacuuUfcCfAfGfcaaacuccaL 96	453	usGfsgaguuuugcugGfaAfagugasgs a	637	UCUCACUUUCAGCAAAAC UCCC	821
AD-85453	uscscucAfaCfUfGfagaagaaaL 96	454	usUfsucucauccagUfuGfagggasgsu	638	ACUCCUCAACUGGAUGAA GAAA	822
AD-85454	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL 96	455	usAfsgcugcucacagGfuAfcucusas u	639	AUGAGAGUACCUGUGAGCA GCUG	823
AD-85455	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL 96	456	asAfsgcuggucgguuGfgAfaucusus u	640	AAAGAAUCCAACCGACCA GCUU	824

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85456	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	457	usAfsuacacagcaaaCfaGfgaaugsgsg	641	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAUG	825
AD-85457	gsasauucCfaAfCfCfaccagcuuaL96	458	usAfsagcuggucggUfgGfaauucsusu	642	AAGAAUCCAACCGACCAGCUUG	826
AD-85458	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	459	usAfsgguaucucucaUfgUfggaugsasc	643	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	827
AD-85459	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	460	usAfsacagcaaaCfaGfgAfaugggscsg	644	CGCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	828
AD-85460	csusggguUfuAfUfUfuuagagaauaL96	461	usAfsuucucuaaaaUfaAfcccagscsa	645	UGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG	829
AD-85461	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	462	asUfsucucuaaaaUfaCfccagscsa	646	UUGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	830
AD-85462	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuuaL96	463	asUfsagcucacugugCfaUfgccausasu	647	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	831
AD-85463	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	464	usUfsagacucuguggGfcUfcucucsusc	648	GAGAGAGAGCCCACAGAGUCUAC	832
AD-85464	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	465	usCfsgcuaaacacugGfuUfcuugcscsu	649	AGGCAAGAACCAGUGUUUAGCGC	833
AD-85465	cscsagcaAfaAfCfUfccucaacuaL96	466	usAfsguugagggaguUfuUfgcuggsas	650	UCCAGCAAAACUCCUCAACUG	834
AD-85466	csasccucGfuCfAfUfccacaugaaL96	467	usUfscuuuguggaugAfcGfaggugsgs	651	UCCACCUCGUCAUCCACAAUGAG	835
AD-85467	csgsucuuCfcAfCfAfaugagaguaaL96	468	usUfsacucucuuuguGfgAfugacgsasg	652	CUCGUCAUCCACAAUGAGAAUG	836

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96				GUAC	
AD-85468	csuscccaCfGcFfCfucuggacuuaL 96	469	usAfsaguccagagagCfGfUfgggagsgsa	653	UCCUCCCACGCUCUCUGGA CUUC	837
AD-85469	asascuccCfUcFfAfcuggaugaaaL 96	470	usUfsucauccaguugAfgGfgaguusus u	654	AAAACUCCCUCAACUGGAU GAAG	838
AD-85470	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL 96	471	asUfsgaaccugucaaUfcUfucucasgsc	655	GCUGAGAAGAUUGACAGGU UCAU	839
AD-85471	cscsucguCfaUfCfCfacaugagaaL 96	472	usUfscucauuguggaUfgAfcgaggsus g	656	CACCUCGUCAUCCACAAUG AGAG	840
AD-85472	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucaua L96	473	usAfsugaaccugucaAfuCfuucucsasg	657	CUGAGAAGAUUGACAGGUU CAUG	841
AD-85473	csusucuuGfgGfCfUfuccguauaua L96	474	usAfsuauacggaagcCfcAfagaagsusu	658	AACUUCUUGGGCUUCCGUA UAUA	842
AD-85474	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL 96	475	usAfsuuguggaugacGfaGfguggasas g	659	CUUCCACCUCGUCAUCCAC AAUG	843
AD-85475	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcaga L96	476	usCfsugcaugaaccuGfuCfaucususc	660	GAAGAUUGACAGGUUCAUG CAGG	844
AD-85476	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL 96	477	usUfscucauccaguUfgAfgggagsusu	661	AACUCCCUCAACUGGAUGA AGAA	845
AD-85477	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaal 96	478	usUfsgcucacagguaCfuCfucuuusgsu	662	ACAAUGAGAGUACCUGUGA GCAG	846
AD-85478	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL 96	479	asCfsuca(Tgn)uagaagaAfaAfggugg sgsa	663	UCCACCUUUUCUUCUAAU GAGU	847

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85479	csgsaccaGfcUfUfGfuuuugugaaaaL96	480	usUfsuuc(Agn)caaacaGfcUfggucgsgsu	664	ACCGACCAGCUUGUUUGUGAAAC	848
AD-85480	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucal96	481	usGfsacu(Cgn)auuagaaGfaAfaaggusgsg	665	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGUCG	849
AD-85481	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacal96	482	usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa	666	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	850
AD-85482	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	483	usUfscac(Agn)gguacucUfcAfuugugsgsa	667	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	851
AD-85483	gsuscuccCfaCfCfUfuuuucuaal96	484	usUfsaga(Agn)gaaaaggUfgGfgagacsusg	668	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	852
AD-85484	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccual96	485	usAfsggg(Agn)guuuugcUfgGfaaagusgsa	669	UCACUUUCCAGCAAAACUCUCCUC	853
AD-85485	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaacuL96	486	asGfsuuu(Cgn)uucauccAfgUfugaggsgsa	670	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	854
AD-85486	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaal96	487	usUfsgau(Cgn)auacacaGfcAfaacagsgsa	671	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	855
AD-85487	ususugcuGfuGfUfAfugaucaagaal96	488	usCfsuuu(Ggn)aucuacAfcAfgcaaaascsa	672	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	856
AD-85488	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaal96	489	usUfsuca(Cgn)aaacaagCfuGfgucggsusu	673	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	857
AD-85489	uscscaacCfGfCfCfagcuuguuuuL96	490	usAfsaac(Agn)agcugguCfgGfuuggasasu	674	AUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	858
AD-85490	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	491	asUfsaca(Cgn)agcaaacAfgGfaaugg	675	GCCCAUCCUGUUUGCUGUGUUUG	859

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	L96		sgsc		GUAU	
AD-85491	csasccuuUfuCfUfUfcuaaagaguaL96	492	usAfs cuc(Agn)uuagaagAfaAfaggu gsgsg	676	CCCACCUUUUCUUCUAAUG AGUC	860
AD-85492	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	493	usUfsuug(Agn)ucauacaCfaGfcaaac sasg	677	CUGUUUGCUGUGUAUGAUC AAAG	861
AD-85493	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	494	usAfsacc(Tgn)gucaaucUfuCfucagc sasg	678	CUGCUGAGAAGAUUGACAG GUUC	862
AD-85494	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL96	495	usUfsuga(Ggn)ggaguuuUfgCfugga asasg	679	CUUUC CAGCAAACUCCCU CAAC	863
AD-85495	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguuL96	496	asAfsccu(Ggn)ucaaucUfcUfcagca sgsc	680	GCUGCUGAGAAGAUUGACA GGUU	864
AD-85496	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	497	usAfs guu(Tgn)ugcuggaAfaGfugag ascsc	681	GGUCUCACUUUC CAGCAAAC ACUC	865
AD-85497	uscsacacAfuGfAfGfaguaccuguaL96	498	usAfs cag(Ggn)uacucucAfuUfgugg asusg	682	CAUCCACAAUGAGAGUACC UGUG	866
AD-85498	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL96	499	usCfsauu(Ggn)uggaugaCfgAfggug gsasa	683	UUC CACUUCGUCAUCCACA AUGA	867
AD-85499	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	500	usGfsgag(Tgn)uuugcugGfaAfagug asgsa	684	UCUCACUUUC CAGCAAAC UCCC	868
AD-85500	uscsccucAfaCfUfGfgaugaagaaaL96	501	usUfsucu(Tgn)cauccagUfuGfagga sgsu	685	ACUCCCUCAACUGGAUGAA GAAA	869
AD-85501	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	502	usAfs gcu(Ggn)cucacagGfuAfcucuc sasus	686	AUGAGAGUACCUGUGAGCA GCUG	870

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85502	asgsaaauCfcAfAfCfcgaccagcuuL96	503	asAfsghu(Ggn)gucgguuGfgAfaauucususu	687	AAAGAAUUCCAACCGACCA GCUU	871
AD-85503	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	504	usAfsuac(Agn)cagcaaaCfaGfgaaugsgsg	688	CCCAUUCCUGUUUGCUGUG UAUG	872
AD-85504	gsasauucCfaAfCfCfCgaccagcuuaL96	505	usAfsagc(Tgn)ggucggUfgGfaauucsuu	689	AAGAAUCCAACCGACCAG CUUG	873
AD-85505	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	506	usAfsghu(Agn)cucucuUfgUfggaugsasc	690	GUCAUCCACAAUGAGAGUA CCUG	874
AD-85506	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	507	usAfsac(Agn)gcaacaGfgAfaugggscsg	691	CGCCAUUCCUGUUUGCUG UGUA	875
AD-85507	csusggguUfuAfUfUfuagagaauaL96	508	usAfsuuc(Tgn)cuaaaUfaAfcaccagscsa	692	UGCUGGGUUUAUUUAGAG AAUG	876
AD-85508	gscsugguUfuUfAfUfuuuagagaauL96	509	asUfsucu(Cgn)uaaaaUfaCfccagcsasa	693	UUGCUGGGUUUAUUUAGA GAAU	877
AD-85509	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	510	asUfsagc(Tgn)cacugugCfaUfgccausasu	694	AUAUGGCAUGCACAGUGAG CUAU	878
AD-85510	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	511	usUfsaga(Cgn)ucuguggGfcUfcucucsu	695	GAGAGAGAGCCCACAGAGU CUAC	879
AD-85511	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	512	usCfsgcu(Agn)aacacugGfuUfcuugcscsu	696	AGGCAAGAACCAGUGUUUA GCGC	880
AD-85512	cscsagcaAfaAfCfUfccucaacuL96	513	usAfsghu(Ggn)aggagUfuUfgcuggsasa	697	UCCAGCAAAACUCCUCA ACUG	881
AD-85513	csasccucGfuCfAfUfccacaugaaL96	514	usUfscau(Tgn)guggaugAfcGfaggu	698	UCCACCUCGUCAUCCACAA	882

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96		gsgsa		UGAG	
AD-85514	csgsucuCfcAfCfAfaugagaguaaL 96	515	usUfsacu(Cgn)ucauuguGfgAfugac gsasg	699	CUCGUCAUCCACAAUGAGA GUAC	883
AD-85515	csuscccaCfGfUfCfucuggacuuaL 96	516	usAfsagu(Cgn)cagagagCfGfUfggga gsgsa	700	UCCUCCCACGCUCUCUGGA CUUC	884
AD-85516	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL 96	517	usUfsuca(Tgn)ccaguugAfgGfgagu ususu	701	AAAACUCCCUCAACUGGAU GAAG	885
AD-85517	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL 96	518	asUfsgaa(Cgn)cugucaaUfcUfucuca sgsc	702	GCUGAGAAGAUUGACAGGU UCAU	886
AD-85518	cscsucguCfaUfCfCfacaugagaaL 96	519	usUfscuc(Agn)uuguggaUfgAfcgag gsusg	703	CACCUCGUCAUCCACAAUG AGAG	887
AD-85519	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucaua L96	520	usAfsuga(Agn)ccugucaAfuCfuucu csasg	704	CUGAGAAGAUUGACAGGUU CAUG	888
AD-85520	csusucuuGfgGfCfUfuccguauuaa L96	521	usAfsuau(Agn)cggaagcCfcAfagaag susu	705	AACUUCUUGGGCUUCCGUA UAUA	889
AD-85521	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL 96	522	usAfsuug(Tgn)ggaugacGfaGfgugg asasg	706	CUUCCACCUCGUCAUCCAC AAUG	890
AD-85522	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcaga L96	523	usCfsugc(Agn)ugaaccuGfuCfaaucu susc	707	GAAGAUUGACAGGUUCAUG CAGG	891
AD-85523	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL 96	524	usUfscuu(Cgn)auccaguUfgAfggga gsusu	708	AACUCCCUCAACUGGAUGA AGAA	892
AD-85524	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaal 96	525	usUfsgcu(Cgn)acagguaCfuCfucuu sgsu	709	ACAAUGAGAGUACCUGUGA GCAG	893

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85619	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL 96	526	asCfsucau(Tgn)agaagaAfaAfggugg sgsa	710	UCCACCUUUUCUUCUAAU GAGU	894
AD-85620	csgsaccaGfcUfUfGfuuuugugaaaaL 96	527	usUfsuuca(Cgn)aaacaGfcUfggucg sgsu	711	ACCGACCAGCUUGUUUGUG AAAC	895
AD-85621	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucaL 96	528	usGfsacuc(Agn)uuagaaGfaAfaaggu sgsg	712	CCACCUUUUCUUCUAAUGA GUCG	896
AD-85622	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL 96	529	usGfsuacu(Cgn)ucauugUfgGfauga csgsa	713	UCGUCAUCCACAAUGAGAG UACC	897
AD-85623	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL 96	530	usUfscaca(Ggn)guacucUfcAfuugu gsgsa	714	UCCACAAUGAGAGUACCUG UGAG	898
AD-85624	gsuscuccCfaCfCfUfuuuucuuaaL 96	531	usUfsagaa(Ggn)aaaaggUfgGfgagac susg	715	CAGUCUCCCACCUUUUCUU CUAA	899
AD-85625	ascsuuucCfaGfCfAfaaacuccuaL 96	532	usAfsggga(Ggn)uuuugcUfgGfaaag usgsa	716	UCACUUUCCAGCAAAACUC CCUC	900
AD-85626	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaacuL 96	533	asGfsuuuc(Tgn)ucauccAfgUfugagg sgsa	717	UCCCUCAACUGGAUGAAGA AACU	901
AD-85627	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaa L96	534	usUfsgauc(Agn)uacacaGfcAfaacag sgsa	718	UCCUGUUUGCUGUGUAUGA UCAA	902
AD-85628	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaaaga L96	535	usCfsuuug(Agn)ucauacAfcAfgcaaa scsa	719	UGUUUGCUGUGUAUGAUCA AAGC	903
AD-85629	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL 96	536	usUfsucac(Agn)aacaagCfuGfgucgg susu	720	AACCGACCAGCUUGUUUGU GAAA	904
AD-85630	uscscaacCfgAfCfCfagcuuguuuuL 96	537	usAfsaaca(Agn)gcugguCfgGfuugg sgsa	721	AUCCAACCGACCAGCUUG GAAA	905

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96		asasu		UUUG	
AD-85631	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguau L96	538	asUfsacac(Agn)gcaaacAfgGfaaugg sgsc	722	GCCCAUCCUGUUUGCUGU GUAU	906
AD-85632	csasccuuUfuCfUfUfuaaugaguaL 96	539	usAfsuca(Tgn)uagaagAfaAfaggug sgsg	723	CCCACCUUUUCUUCUAAUG AGUC	907
AD-85633	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaa L96	540	usUfsuuga(Tgn)cauacaCfaGfcaaac sasg	724	CUGUUUGCUGUGUAUGAUC AAAG	908
AD-85634	gscsugagAfaGfAfUfugacagguua L96	541	usAfsaccu(Ggn)ucaaucUfuCfucagc sasg	725	CUGCUGAGAAGAUUGACAG GUUC	909
AD-85635	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL 96	542	usUfsugag(Ggn)gaguuuUfgCfugga asasg	726	CUUCCAGCAAAACUCCCU CAAC	910
AD-85636	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguu L96	543	asAfsccug(Tgn)caaucUfcUfcagca sgsc	727	GCUGCUGAGAAGAUUGACA GGUU	911
AD-85637	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL 96	544	usAfsguuu(Tgn)gcuggaAfaGfugag ascsc	728	GGUCUCACUUCCAGCAAA ACUC	912
AD-85638	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL 96	545	usAfsagg(Tgn)acucucAfuUfugga susg	729	CAUCCACAAUGAGAGUACC UGUG	913
AD-85639	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL 96	546	usCfsauug(Tgn)ggaugaCfgAfggug gsasa	730	UCCACCUCGUCAUCCACA AUGA	914
AD-85640	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL 96	547	usGfsgagu(Tgn)uugcugGfaAfagug asgsa	731	UCUCACUUCCAGCAAAAC UCCC	915
AD-85641	uscscucAfaCfUfGfgaugaagaaaL 96	548	usUfsucuu(Cgn)auccagUfuGfaggg asgsu	732	ACUCCUCAACUGGAUGAA GAAA	916

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-85642	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL 96	549	usAfsfcug(Cgn)ucacagGfuAfcucuc sasu	733	AUGAGAGUACCUGUGAGCA GCUG	917
AD-85643	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL 96	550	asAfsfcug(Ggn)ucgguuGfgAfauc ususu	734	AAAGAAUCCAACCGACCA GCUU	918
AD-85644	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguaua L96	551	usAfsuaca(Cgn)agcaaaCfaGfgaaug sgsg	735	CCCAUCCUGUUUGCUGUG UAUG	919
AD-85645	gsasauucCfaAfCfCfaccagcuuaL 96	552	usAfsagcu(Ggn)gucgguUfgGfaauu csusu	736	AAGAAUCCAACCGACCAG CUUG	920
AD-85646	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL 96	553	usAfsggua(Cgn)ucucauUfgUfggau gsasc	737	GUCAUCCACAAUGAGAGUA CCUG	921
AD-85647	cscscauuCfcUfGfUfuugcugugua L96	554	usAfsca(Cgn)caaacaGfgAfauggg scsg	738	CGCCAUUCCUGUUUGCUG UGUA	922
AD-85648	csusggguUfuAfUfUfuagagaaua L96	555	usAfsuucu(Cgn)uaaaauAfaAfcccag scsa	739	UGCUGGGUUUAUUUAGAG AAUG	923
AD-85649	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaau L96	556	asUfsucuc(Tgn)aaaauAfaCfccagcs asa	740	UUGCUGGGUUUAUUUAGA GAAU	924
AD-85650	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL 96	557	asUfsagcu(Cgn)acugugCfaUfgccau sasu	741	AUAUGGCAUGCACAGUGAG CUAU	925
AD-85651	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL 96	558	usUfsagac(Tgn)cuguggGfcUfcucuc susc	742	GAGAGAGAGCCCACAGAGU CUAC	926
AD-85652	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL 96	559	usCfsgcua(Agn)acacugGfuUfcuugc scsu	743	AGGCAAGAACCAGUGUUUA GCGC	927
AD-85653	cscsagcaAfaAfCfUfccucaacuaL	560	usAfsguug(Agn)gggaguUfuUfgcug	744	UCCAGCAAAACUCCUCA	928

Название дуплекса	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
	96		gsasa		ACUG	
AD-85654	csasccucGfuCfAfUfccacaugaal 96	561	usUfscauu(Ggn)uggaugAfcGfaggu gsgsa	745	UCCACCUCGUCAUCCACAA UGAG	929
AD-85655	csgsucuCfcAfCfAfaugagaguaaL 96	562	usUfsacuc(Tgn)cauuguGfgAfugacg sasg	746	CUCGUCAUCCACAAUGAGA GUAC	930
AD-85656	csuscccaCfcCfUfCfucuggacuuaL 96	563	usAfsaguc(Cgn)agagagCfUfggga gsgsa	747	UCCUCCCACGCUCUCUGGA CUUC	931
AD-85657	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL 96	564	usUfsucau(Cgn)caguugAfgGfgagu ususu	748	AAAACUCCCUCAACUGGAU GAAG	932
AD-85658	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL 96	565	asUfsgaac(Cgn)ugucuuUfcUfucuca sgsc	749	GCUGAGAAGAUUGACAGGU UCAU	933
AD-85659	cscsucguCfaUfCfCfacaugagaaL 96	566	usUfscuca(Tgn)uguggaUfgAfcgag gsusg	750	CACCUCGUCAUCCACAAUG AGAG	934
AD-85660	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucaua L96	567	usAfsugaa(Cgn)cugucaAfuCfuucuc sasg	751	CUGAGAAGAUUGACAGGUU CAUG	935
AD-85661	csusucuuGfgGfCfUfuccguauaua L96	568	usAfsuaua(Cgn)ggaagcCfcAfagaag susu	752	AACUUCUUGGGCUUCCGUA UAUA	936
AD-85662	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL 96	569	usAfsuugu(Ggn)gaugacGfaGfgugg asasg	753	CUUCCACCUCGUCAUCCAC AAUG	937
AD-85663	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcaga L96	570	usCfsugca(Tgn)gaaccuGfuCfaaucu susc	754	GAAGAUUGACAGGUUCAUG CAGG	938
AD-85664	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL 96	571	usUfscuuc(Agn)uccaguUfgAfggga gsusu	755	AACUCCCUCAACUGGAUGA AGAA	939

<b>Название дуплекса</b>	<b>Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Модифицированная антисмысловая последовательность, от 5' к 3'</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Целевая последовательность мРНК, от 5' к 3'</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
AD-85665	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaaL 96	572	usUfsgcuc(Agn)cagguaCfuCfucuu sgsu	756	ACAAUGAGAGUACCUGUGA GCAG	940

**Таблица 6. Дополнительные модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой нити средств на основе дсРНК против hAGTT**

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Модифицированная смысловая последовательность, от 5' к 3'	SEQ ID NO :	Диапазон в NM_0000 29.3	Название антисмыслового олигонуклеотида	Модифицированная антисмысловая последовательность	SEQ ID NO :	Диапазон в NM_0000 29.3
AD-126306	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	941	638-658	A-250785	usGfsua(Cgn)ucucauugUfgGfaugacsgsa	951	636-658
AD-126307	A-168477	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaal96	942	644-664	A-250786	usUfsca(Cgn)agguacucUfcAfuugugsgsa	952	642-664
AD-126308	A-168479	gsuscuccCfaCfCfUfuuuucuucuaal96	943	2076-2096	A-250787	usUfsag(Agn)agaaaaggUfgGfgagacsusg	953	2074-2096
AD-126310	A-168483	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaacuL96	944	1603-1623	A-250789	asGfsuu(Tgn)cuucauccAfgUfugaggsgsa	954	1601-1623
AD-126343	A-168549	cscsucguCfaUfCfCfacaugagaal96	945	634-654	A-250822	usUfscu(Cgn)auuguggaUfgAfcgaggsusg	955	632-654
AD-133360	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	946	638-658	A-264752	usGfs(Tgn)acucucauugUfgGfaugacsgsa	956	636-658
AD-133361	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	947	638-658	A-264753	usGfsu(Agn)cucucauugUfgGfaugacsgsa	957	636-658
AD-133362	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	948	638-658	A-264754	usGfsuacuc(Tgn)cauugUfgGfaugacsgsa	958	636-658
AD-133374	A-168479	gsuscuccCfaCfCfUfuuuucuucuaal96	949	2076-2096	A-264766	usUfsagaag(Agn)aaaggUfgGfgagacsusg	959	2074-2096
AD-	A-168477	csascaauGfaGfAfGfuaccug	950	644-664	A-264777	usUfsc(Agn)cagguacucUfcAfu	960	642-664

133385		ugaaL96				ugugsgsa		
--------	--	---------	--	--	--	----------	--	--

**Пример 3. Скрининг *in vivo* дсРНК-дуплексов на мышах, трансдуцированных с помощью AAV, с которого экспрессируется AGT человека**

Для экспрессии ангиотензиногена человека мышей C57/BL6 сначала трансдуцировали с помощью вектора на основе AAV (аденоассоциированного вируса), с которого экспрессируется транскрипт AGT человека. После по меньшей мере двух недель после введения AAV у мышей собирали кровь для определения исходных циркулирующих уровней AGT человека, а затем животным вводили однократную подкожную дозу 3 мг/кг одного из подгруппы средств на основе дсРНК, приведенных в таблицах 5 и 6 (N=3 на группу). Кровь у животных собирали снова через четырнадцать дней после введения дозы средства на основе дсРНК. Уровни AGT человека определяли количественно с использованием ELISA, специфического для ангиотензиногена человека, в соответствии с протоколом производителя (IBL America № 27412). Данные выражали как процент от значения на исходном уровне и представляли как среднее плюс стандартное отклонение. Определенные дсРНК-дуплексы отбирали для дальнейшего анализа.

**Таблица 7. Скрининг однократной дозы 3 мг/кг олигонуклеотидов против AGT у мышей, трансдуцированных с помощью AAV с AGT человека**

ID дуплекса	Среднее значение	SD
AD-67327	13,2	4,5
AD-85110	97,0	3,6
AD-85117	86,7	10,8
AD-85118	107,2	14,2
AD-85434	18,4	0,6
AD-85435	25,7	1,7
AD-85438	12,6	2,7
AD-85446	8,4	1,0
AD-85481	27,0	11,5
AD-85482	64,2	13,0
AD-85482	48,5	5,9
AD-85483	38,9	4,6
AD-85485	63,6	3,0
AD-85493	35,7	20,5
AD-85496	78,5	10,3
AD-85517	93,8	4,6
AD-85524	90,4	14,7
AD-85622	38,1	10,6
AD-85623	28,0	8,4
AD-85625	87,6	13,7
AD-85626	29,9	14,0
AD-85634	27,7	4,5

AD-85635	87,1	13,5
AD-126306	12,4	1,4
AD-126307	21,6	9,0
AD-126308	15,7	1,8
AD-126310	38,3	1,1
AD-126343	65,5	13,4
AD-133360	50,6	7,5
AD-133361	23,2	12,4
AD-133362	12,2	4,1
AD-133374	26,2	3,3
AD-133385	33,8	8,7

#### **Пример 4. Скрининг *in vivo* дсРНК-дуплексов на яванских макаках**

Представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в приведенных выше исследованиях на мышах, оценивали на яванских макаках.. Животным (N=3 на группу) вводили однократную подкожную дозу 3 мг/кг средства на основе дсРНК (AD-85481, AD-126306, AD-126307, AD-126308 или AD-133362) в день 1. Кровь собирали в дни -6, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 32, 35, 43, 57, 71, 85 и 99 после введения дозы. Циркулирующие уровни AGT определяли количественно с помощью ELISA, специфического для ангиотензиногена человека (и перекрестно реактивного с ангиотензиногеном яванского макака), в соответствии с протоколом производителя (IBL America № 27412). Данные выражали как процент от значения на исходном уровне и представляли как среднее плюс/минус стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 1А. Явные отличия между AD-85481, AD-126306 и AD-133362 находятся в пределах диапазона типичной изменчивости между исследованиями на отличных от человека приматах.

Для оценки активности AD-67327 и AD-85481 проводили исследования зависимости ответа от дозы. Хотя эксперименты выполняли отдельно, используемые методы были по сути одинаковыми, и результаты представлены совместно на фигуре 1В. Яванским макакам вводили однократную подкожную дозу 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг средства на основе дсРНК в день 1. Кровь собирали в день -6, 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 и 78 после введения дозы в случае AD-67327 и в день -6, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 32, 35, 43, 57, 71, 85 и 99 после введения дозы в случае AD-85481. Циркулирующие уровни AGT определяли количественно с помощью ELISA, специфического для ангиотензиногена человека (и перекрестно реактивного с ангиотензиногеном яванского макака), в соответствии с протоколом производителя (IBL America № 27412). Данные выражали как процент от значения на исходном уровне и представляли как среднее плюс стандартное отклонение. Результаты показаны на фигуре 1В. Эти данные продемонстрировали примерно 3-кратное увеличение эффективности и продолжительности ответа в случае AD-85481 в сравнении с AD-67327.

Многодозовые исследования проводили для определения эффективности и стойкости ответа на AD-67327 и AD-85481. Хотя эксперименты выполняли отдельно,

используемые методы были по сути одинаковыми, и результаты представлены совместно на фигуре 1С. Яванским макакам подкожно вводили дозу 1 мг/кг AD-67327 или AD-85481 раз в четыре недели в течение трех недель (введение дозы q4w) (дни 1, 29 и 57 после первой дозы). Для оценки циркулирующих уровней AGT кровь собирали в дни -6, 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 и 78 после введения первой дозы AD-67327 и в дни -8, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 57, 64, 71, 85, 99 после введения первой дозы AD-85481. Эти данные продемонстрировали увеличение эффективности и продолжительности целевого сайленсинга под действием AD-85481 в сравнении с AD-67327.

#### **Пример 5. Лечение гипертензии с помощью дсРНК против AGT на крысиной модели спонтанной гипертензии**

Чтобы протестировать эффект нокдауна AGT на крысиной модели спонтанной гипертензии, разрабатывали дсРНК, специфическую для крысы. Крысам со спонтанной гипертензией (N=9 на группу) подкожно вводили дозу 10 мг/кг дсРНК, специфической против AGT крысы, один раз в 2 недели (10 мг/кг, q2w) или ежедневно пероральные дозы ARB, валсартана (31 мг/кг/день), или ежедневно пероральные дозы ингибитора ACE, каптоприла (100 мг/кг/день). Также оценивали выбранные комбинации (средство на основе дсРНК, специфической для крысы, плюс валсартан или каптоприл плюс валсартан), которые вводили дозами, как упомянуто выше. Среднее артериальное давление измеряли с помощью телеметрии в течение 4-недельного периода. После четырех недель обработки животных анестезировали с помощью i.p. инъекции пентобарбитала, и кровь собирали из воротной вены печени для измерения уровней AGT в плазме крови, ренина в плазме крови, ангиотензина II в плазме крови, альдостерона в плазме крови, K<sup>+</sup> в плазме крови и активности ренина в плазме крови. Также получали значения массы сердца и длины голени (для нормализации значений массы сердца).

Обработка средством на основе дсРНК, специфической для крысы, приводила к нокдауну уровней AGT в плазме крови более чем на 98% при введении средства отдельно или в комбинации с валсартаном по сравнению с уровнями до обработки (фигура 2А). Также было также продемонстрировано, что обработка комбинацией валсартана и каптоприла приводила к значимому снижению уровней AGT в сыворотке крови. Все варианты обработки приводили к повышению уровня ренина, причем наибольшее повышение произошло у животных, обработанных комбинацией валсартана и средства на основе дсРНК, с последующим значительным увеличением в группе, обработанной средством на основе дсРНК отдельно. Было обнаружено, что циркулирующие уровни ангиотензина II снижались только при комбинированной обработке валсартаном и средством на основе дсРНК. Тенденцию к снижению уровня AGT в моче наблюдали после обработки средством на основе дсРНК, что позволяет предположить, что уровни белка AGT в почке не подавлялись значимо при обработке средством на основе дсРНК (фигура 3). Было обнаружено, что уровни AGT в моче значимо снижались только в случае комбинации валсартана и средства на основе дсРНК. Ни один из вариантов обработки не изменял уровни альдостерона. Уровни K<sup>+</sup> в плазме крови проявляли тенденцию к увеличению во всех

группах, при этом значимость достигалась только в группе обработки комбинацией валсартан плюс онРНК.

На фигуре 2В показаны средние уровни артериального давления, измеренные с помощью телеметрии на протяжении всего эксперимента и нанесенные на график относительно начальных уровней кровяного давления. Каждый из вариантов обработки вызывал статистически значимое снижение кровяного давления в сравнении с необработанными животными. Результаты статистических сравнений ( $p < 0,05$ ) отмечены относительно исходного уровня (#) или валсартана плюс каптоприл (\$). Обработка валсартаном плюс средство на основе дсРНК, специфической для крысы, обеспечивала значимо лучший эффект снижения среднего артериального давления, чем обработка каптоприлом плюс валсартан.

На фигуре 2С представлены значения массы сердца, нормализованные по длине большеберцовой кости с получением показателя гипертрофии сердца. Обе обработки валсартаном плюс каптоприл и валсартаном плюс средство на основе дсРНК были эффективными в снижении гипертрофии сердца по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), при этом валсартаном плюс средство на основе дсРНК также снижали гипертрофию сердца в сравнении с валсартаном плюс каптоприл ( $p < 0,05$ ). На фигуре 2Е изображены те же данные в виде диаграммы рассеяния соотношения массы сердца и длины большеберцовой кости в зависимости от MAP. Наблюдали линейную зависимость между гипертрофией сердца и MAP, при этом валсартаном плюс средство на основе дсРНК обеспечивали наибольшее снижение гипертрофии сердца. Размер кардиомиоцитов снижался у всех групп относительно группы среды-носителя, за исключением группы валсартана (фигура 2F), тогда как уровень NT-проBNP снижался в группе каптоприл плюс валсартан, и тенденцию к снижению наблюдали в группе валсартан плюс дсРНК (фигура 2G).

На фигуре 2D показан относительный уровень активности ренина на 4 неделе относительно исходного уровня. Активность ренина в плазме (PRA), которая отражает снижение передачи сигнала с участием ангиотензина, указывает на явное увеличение PRA при обработке средством на основе дсРНК ( $p < 0,05$  относительно как исходного уровня, так и контрольной группы, для обоих случаев средства на основе дсРНК отдельно и комбинации валсартан плюс онРНК). В анализе PRA измеряют активность ренина путем количественного определения количества ангиотензина I, продуцируемого ренином в образце крови, в присутствии избытка ангиотензиногена. Эти данные демонстрируют снижение передачи сигнала с участием ангиотензина II после обработки средством на основе дсРНК против AGT, а также то, что такой эффект усиливается при совместной обработке с валсартаном. Вследствие повышенной экспрессии циркулирующий уровень ангиотензина II остается без изменений даже при практически полном нокдауне уровней AGT. Эти данные демонстрируют, что средство на основе дсРНК против AGT вызывает гипотензивный эффект, аналогичный эффекту, который обеспечивают валсартан и каптоприл. Без ограничиваясь теорией, было высказано предположение, что уровни ангиотензина II действительно падают только под действием комбинации средства на

основе дсРНК плюс валсартан, что приводит к синергетическому снижению кровяного давления.

Эффект различных вариантов обработки на уровни AngI и AngII в крови и почках исследовали через четыре недели после обработки. На фигурах 4А-4С показано, что обработка валсартаном и каптоприлом, либо по отдельности, либо в комбинации, значимо увеличивала уровни AngI в крови в сравнении с контрольной группой среды-носителя (фигура 4А). Средство на основе дсРНК само по себе не вызывало значимого изменения уровней AngI в крови, но комбинация валсартана со средством на основе дсРНК значимо снижала уровень AngI в крови в сравнении с контрольной группой среды-носителя и группой обработки средством на основе дсРНК отдельно. Было обнаружено, что валсартан отдельно значимо увеличивал уровень AngII в крови в сравнении с контрольной группой среды-носителя (фигура 4В). Было обнаружено, что комбинация валсартана со средством на основе дсРНК значимо снижала уровень AngII в крови по сравнению с контрольной группы среды-носителя. Данные изменения приводили к значимому снижению соотношения  $AngII/AngI$  у животных, обработанных каптоприлом и каптоприлом+валсартаном. Данные по каптоприлу и валсартану соответствовали механизму их действия, тогда как данные по дсРНК отдельно указывали на незначительный эффект на уровень  $AngII/I$  в крови.

На фигурах 5А-5С показано, что средство на основе дсРНК снижало уровень AngI в почках без видимого эффекта в отношении уровня AngII в почках, что приводило к повышению соотношения  $AngII/I$  в почках. На фигуре 5А показано, что как валсартан, так и каптоприл значимо увеличивали уровень AngI в почках, тогда как комбинация данных средств не оказывала значительного эффекта на уровень AngI. Уровень AngI в почках значимо снижался под действием средства на основе дсРНК и комбинации средства на основе дсРНК с валсартаном. Более того, комбинированная обработка значимо снижала уровень AngI в почках по сравнению с обработкой средством на основе дсРНК отдельно. На фигуре 5В показано, что значимое изменение уровня AngII в почках отсутствовало после обработки любым из вариантов монотерапии, за исключением каптоприла, т. е. валсартаном или средством на основе дсРНК отдельно. Однако было продемонстрировано, что комбинация каптоприла и валсартана и комбинация валсартана и средства на основе дсРНК значимо снижали уровень Ang II в почках. Данные по каптоприлу и валсартану соответствовали механизму их действия, тогда как данные по дсРНК отдельно указывали на незначительный явный эффект на уровень AngII в почках. Соотношение  $AngII/AngI$  в почках увеличивалось в 4 раза после введения средства на основе дсРНК против AGT отдельно (фигура 5С). И наоборот, после обработки валсартаном, каптоприлом и комбинацией валсартан+каптоприл наблюдали снижение соотношения  $Ang II/Ang I$  более чем на 70%. Значимое изменение соотношения  $AngII/AngI$  отсутствовало после обработки валсартан+средство на основе дсРНК против AGT. Было продемонстрировано, что увеличение уровня AngII в почках не было следствием изменений уровней рецепторов ангиотензина в почках или экспрессии мРНК ACE в корковом или мозговом веществе

почек. На фигурах 6А-6С показано, что при любых условиях обработки, за исключением одного, значимые изменения уровней рецептора AT1a, рецептора AT1b или мРНК ACE в почке отсутствовали. Обработка каптоприлом вызывала значимое увеличение уровня рецептора AT1b в мозговом веществе почки. Также оценивали эффект схем обработки на функцию почек. Не наблюдали никаких изменений скорости клубочковой фильтрации (GFR), натрийуреза и альбуминурии. Это указывает на то, что данные варианты обработки не нарушали функцию почек.

Во время эксперимента отслеживали объем мочи и уровень натрия в моче. Обработка валсартаном+средством на основе дсРНК, валсартаном+каптоприлом и каптоприлом отдельно вызывала значимое увеличение объема мочи в пределах группы в период от исходного уровня до 4 недель (фигура 7). Сравнение объема мочи между группами через 4 недели показало значимое увеличение диуреза у животных, обработанных каптоприлом, по сравнению со всеми остальными группами. Обработка валсартаном+средством на основе дсРНК приводила к значимому увеличению диуреза через 4 недели по сравнению с обработкой валсартаном отдельно или средой-носителем. В ходе эксперимента никаких значимых изменений уровня натрия в моче не наблюдали между группами или в пределах группы.

Эти данные демонстрируют, что снижение соотношения Ang II/I в почках на фоне применения как ACEi, так и ARB подтверждает, что почечная ACE приводит к образованию Ang II, и что тканевой Ang II представляет собой Ang II, интернализированный за счет AT1R (van Esch *et al.*, *Cardiovasc Res* 2010 86(3):401-409). Кроме того, снижение уровня Ang I в почках после обработки онРНК против AGT, наливающейся на печень, демонстрировало, что образование Ang в почках зависит от печеночного AGT. Хотя AGT в моче частично имел почечное происхождение, данный почечный AGT не вносил вклад в образование Ang в почках, как и предполагалось ранее (Matsusaka *et al.*, *JASN* 2012 23: 1181-1189). Повышенное соотношение Ang II/I в почках после обработки с помощью дсРНК против AGT, которая обеспечивает отсутствие изменения уровней Ang II в почках, может свидетельствовать об усиленной интернализации Ang II, хотя и без повышенной экспрессии рецептора AT1b. В соответствии с данной концепцией аддитивное воздействие ARB приводило к практически полному устранению Ang II в почках. Обработка средством на основе дсРНК против AGT, специфической для печени, синергичным образом снижала артериальное давление при использовании в комбинации с существующими блокаторами RAS и снижала выработку Ang в почках без очевидных отрицательных эффектов в отношении функции почек.

#### **Пример 6. Лечение гипертензии с помощью дсРНК против AGT на крысиной модели при высоких уровнях солей**

Крысиная модель с использованием ацетатной соли дезоксикортикостерона (DOCA) является хорошо зарекомендованной моделью гипертензии в контексте высоких уровней соли и считается моделью нейрогенной гипертензии вследствие ее эффекта на центральную и периферическую нервные системы (Basting T & Lazartigues E, *Cur Hypertension Rep* 2017).

После поступления крысам линии Sprague-Dawley обеспечивали возможность акклиматизироваться в течение 7 дней. Затем крысам внутривенно, в брюшную аорту, имплантировали передатчики телеметрии, при этом использовали анестезию изофлураном. Крыс оставляли на 10 дней для восстановления после этой процедуры. С этого момента кровяное давление, частоту сердечных сокращений и другие показатели гипертензии измеряли с помощью телеметрии в течение 7-недельного периода времени. В течение первых 4 недель для индуцирования гипертензии животным подкожно имплантировали гранулы с 200 мг DOCA и на постоянной основе давали 0,9% соли в питьевой воде (*ad libidum*). По окончании этого периода, во время которого развивалась гипертензия, начинали 3-недельный период обработки. Крыс обрабатывали:

- 1) средой-носителем;
- 2) валсартаном, 31 мг/кг/день, добавляемым в питьевую воду;
- 3) средством на основе дсРНК против AGT, 10 мг/кг раз в две недели, подкожно;
- 4) спиронолактоном, 50 мг/кг/день, подкожно; комбинацией средства на основе дсРНК против AGT, 10 мг/кг раз в две недели, подкожно, и валсартана, 31 мг/кг/день, добавляемого в питьевую воду;
- 5) средством на основе дсРНК против AGT, 10 мг/кг раз в две недели, подкожно, и спиронолактоном, 50 мг/кг/день, подкожно;
- 6) валсартаном, 31 мг/кг/день, добавляемый в питьевую воду, и спиронолактоном, 50 мг/кг/день, подкожно; или
- 7) средством на основе дсРНК против AGT, 30 мг/кг раз в две недели, подкожно. В дополнение к этому, одна группа крыс, которые не получали DOCA и соль в питьевой воде, служила в качестве контролей для оценки эффекта вариантов обработки в отношении нормализации кровяного давления.

**Пример 7. Лечение ожирения с помощью средства на основе дсРНК против AGT на модели индуцированного рационом ожирения (DIO) у мышей, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров**

Приобретали мышей с ожирением (ожирение, индуцированное рационом (DIO)), выращенных на корме с высоким содержанием жиров (HFF), и контрольных животных с нормальным весом возрастом шестнадцать недель и содержали их на соответствующем рационе с высоким содержанием жиров (60% калорий в виде жиров) или нормальном корме. После акклиматизации животных разделили на четыре группы: нормальный вес+PBS; нормальный вес+дсРНК против AGT; DIO+PBS и DIO+дсРНК против AGT (n=5/группа). Животным вводили 10 мг/кг дсРНК, специфической для мыши, или PBS раз в две недели в течение 12 недель, начиная с недели 0. Животных взвешивали и собирали у них кровь раз в две недели. Уровни AGT в сыворотке крови определяли с помощью ELISA. Тест на переносимость глюкозы натошак проводили перед введением дозы, через 6 недель после введения первой дозы и через двенадцать недель после введения первой дозы. В конце исследования определяли массу органов.

Начиная с первого момента времени, т. е. через две недели после первого введения

средства на основе дсРНК, введение средства на основе дсРНК против AGT было эффективным в сайленсинге AGT как у животных на корме с высоким содержанием жиров, так и у животных на нормальном корме с устойчивым нокдауном, составлявшим приблизительно 93% у разных групп с обработкой средством на основе дсРНК против AGT.

Начиная с двух недель после введения первой дозы, обработка средством на основе дсРНК против AGT была эффективной в значимом снижении прироста массы в сравнении с мышами DIO, обработанными PBS, как определено с помощью двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений у мышей DIO, и данный эффект сохранялся на протяжении всего исследования (фигура 8A). При анализе сравнения с начальными значениями массы у группы DIO+дсРНК против AGT до последнего момента времени отсутствовал прирост массы относительно начального значения массы. До последнего момента времени у мышей либо происходило уменьшение массы относительно начального значения массы (недели 2, 4, 6), либо не было отличия в массе (недели 8, 10). Значимого отличия массы у мышей, которых кормили кормом с обработкой PBS и средством на основе дсРНК против AGT, не наблюдали до недель 10 и 12 исследования.

В конце исследования определяли значения массы органов для оценки эффекта обработки средством на основе дсРНК против AGT на местоположение жировых отложений. Значения массы печени у мышей DIO, обработанных средством на основе дсРНК против AGT, были значимо ниже, чем у мышей DIO, обработанных PBS (фигура 8B). Не наблюдали значимого отличия в массе печени между мышами, которых кормили нормальным кормом с обработкой средством на основе дсРНК против AGT и PBS. Масса жировой ткани (придаток яичка) была статистически выше в группе DIO+дсРНК против AGT, чем в группе DIO+PBS, тогда как у животных с нормальным весом была обратная ситуация. Не было значимого отличия в значениях массы икроножной мышцы среди всех четырех групп.

Тесты на переносимость глюкозы проводили на неделе 0 (перед введением дозы), неделе 6 и неделе 12 с использованием стандартного протокола. Уровень глюкозы в крови измеряли перед введением дозы, через 30, 60, 90 и 120 минут после внутрибрюшинного введения болюсной дозы глюкозы с помощью глюкометра AlphaTRAK®2 (Abbott Animal Health). Результаты показаны на фигурах 9A-9C. На неделе 0 мыши DIO характеризовались сниженной переносимостью глюкозы по сравнению с контрольными мышами, которых кормили кормом. Через шесть недель наблюдали значимое отличие в апостериорном исследовании с множеством сравнений между мышами DIO, обработанными средством на основе дсРНК против AGT, и мышами DIO, обработанными PBS. Через двенадцать недель, за исключением одного животного DIO+PBS, у которого значения были выше предела измерения глюкометра, все еще сохранялось значимое отличие между мышами DIO, обработанными средством на основе дсРНК против AGT, и мышами DIO, обработанными PBS. В дополнение к этому, данные, полученные на группе DIO+дсРНК к AGT через шесть или двенадцать недель, не отличались ни от одной из контрольных групп (мышы, которых кормили кормом с обработкой средством на основе дсРНК против AGT или PBS).

### **Пример 8. Лечение NASH с помощью средства на основе дсРНК против AGT на мышинной модели на корме с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы**

Модель NASH на мышах, которых кормили кормом с высоким содержанием жиров и высоким содержанием фруктозы (HF HFr) (Softic et al. J Clin Invest 127 (11):4059-4074, 2017, включена в данный документ посредством ссылки), использовали для демонстрации эффективности онРНК против AGT для лечения NASH и симптомов метаболического нарушения.

Самцов мышей C57BL/6 возрастом шесть-восемь недель, полученных из компании Jackson Laboratories, кормили рационом с высоким содержанием жиров, содержащим 60% калорий в виде жира плюс 30% фруктозы в воде (рацион Hf Hfr), в течение 12 недель до обработки средством на основе дсРНК против AGT или PBS (контроль), чтобы индуцировать NASH, или кормили рационом со стандартным кормом и водой. Еду и воду предоставляли *ad libitum*. Начиная с недели 12, мышам, которых кормили HF HFr, подкожно вводили дозу 10 мг/кг средства на основе дсРНК, нацеливающегося на AGT, раз в две недели в суммарном количестве четырех доз. Через две недели после введения последней дозы (на неделе 20) печени собирали, выделяли РНК и нокдаун AGT в печени определяли посредством RT-qPCR с помощью способа, описанного выше. У мышей, которых кормили Hf Hfr с обработкой средством на основе дсРНК против AGT, наблюдали уменьшение уровня мРНК AGT на 93% в сравнении с мышами, которых кормили HF HFr с обработкой посредством PBS.

Как и ожидалось, во все моменты времени масса тела (фигура 10A), совокупный прирост массы (фигура 10B) и конечная масса печени были значимо выше у контрольных мышей, которых кормили HF HFr, по сравнению с мышами, которых кормили кормом. Обработка средством на основе дсРНК против AGT приводила к уменьшению массы у мышей с HF HFr от недели 12 до недели 20, что приводило к значимому снижению конечной массы тела в сравнении с мышами с обработкой контролем ( $p=0,0023$ ). Значимого отличия в конечных значениях массы печени не наблюдали.

Чтобы определить эффект средства на основе дсРНК в отношении модели с HF HFr, производили оценку уровней липидов и глюкозы в сыворотке крови и печени, а также уровня инсулина в сыворотке крови. На неделе 20 уровни триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови были практически одинаковыми у всех трех групп (нормальный корм, HF HFr и дсРНК, HF HFr и контроль). Как и ожидалось, уровни холестерина и инсулина в сыворотке крови были приблизительно одинаковыми у обеих групп с HF HFr и значимо выше, чем у группы, которую кормили кормом. Продемонстрировано, что обработка средством на основе дсРНК против AGT значимо снижает уровень неэтерифицированных жирных кислот (NEFA) в сыворотке крови ( $p=0,01$ ). В печени уровень холестерина был повышен у обеих групп с HF HFr по сравнению с контролем с нормальным кормом, но, опять же, значимого снижения после обработки средством на основе дсРНК против AGT не наблюдали. Значимое снижение уровней триглицеридов ( $p=0,017$ ) и свободных жирных

кислот ( $p=0,001$ ) в печени наблюдали у группы, обработанной средством на основе дсРНК против AGT, в сравнении с группой с обработкой контролем. У группы, обработанной дсРНК против AGT, наблюдали возможную тенденцию к снижению уровня тиобарбитуровой кислоты (ТВА), которая является индикатором окисления липидов.

Значимое увеличение уровней аланинаминотрансферазы (ALT), аспаратаминотрансферазы (AST) и глутаматдегидрогеназы (GLDH) в сыворотке крови указывало на повреждение печени у мышей с Hf HFr и обработкой контролем, в сравнении с мышами, которых кормили кормом. Обработка средством на основе дсРНК против AGT приводила к значимому снижению уровня ALT ( $p=0,01$ ) (фигура 11A), при этом наблюдалась тенденция к снижению уровней AST (фигура 11B) и GLDH (фигура 11C) в сравнении с мышами с HF HFr и обработкой контролем.

Повреждение печени также оценивали с помощью гистопатологического исследования и баллов NAS. Как и ожидалось, рацион HF HFr индуцировал значительный стеатоз, баллонизирующую дегенерацию и дольковое воспаление, что приводило к увеличению общего балла NAS в сравнении с мышами, которых кормили кормом. Обработка средством на основе дсРНК против AGT приводила к значимому снижению баллонизирующей дегенерации ( $p=0,04$ ), при этом наблюдалась тенденция к снижению долькового воспаления, что приводило к значимому уменьшению общего балла NAS ( $p=0,01$ ) у животных, которых кормили HF HFr с обработкой средством на основе дсРНК против AGT, в сравнении с животными, которых кормили HF HFr с обработкой контролем.

Эти данные демонстрируют, что обработка средством на основе дсРНК против AGT является эффективной в снижении интенсивности некоторых симптомов NASH. Следует отметить, что обработка средством на основе дсРНК против AGT была эффективной в снижении массы и уровней ферментов, свидетельствующих о повреждении печени, при этом наблюдали значимое снижение уровня ALT и небольшое снижение уровней AST и GLDH. Также наблюдали снижение долькового воспаления и баллов баллонирования, что снижало общий балл NAS.

### **ЭКВИВАЛЕНТЫ**

Специалисты в данной области техники распознают или будут способны определить, используя лишь стандартный экспериментальный подход, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охвачены объемом следующей формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) для подавления экспрессии ангиотензиногена (AGT), где средство на основе дсРНК содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303 или 2282-2304 из SEQ ID NO:1, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2.

2. Средство на основе дсРНК по п. 1, где смысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303 или 2282-2304 из SEQ ID NO:1.

3. дсРНК по п. 1 или п. 2, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 21 смежный нуклеотид из нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO:2.

4. Средство на основе дсРНК по п. 1, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

5. Средство на основе дсРНК по п. 4, где смысловая нить содержит по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

6. Средство на основе дсРНК по п. 1, где смысловая и антисмысловая нити содержат нуклеотидные последовательности любого из дуплексов, выбранных из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437,

AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

7. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-6, где средство на основе дсРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

8. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-7, где практически все нуклеотиды смысловой нити и практически все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию.

9. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-7, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию.

10. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 7-9, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, нарушающего термостабильность нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

11. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 7-10, где модификации в нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и GNA и их комбинаций.

12. Средство на основе дсРНК по п. 11, где модификации в нуклеотидах представляют собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

13. дсРНК по любому из пп. 7-9, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-

(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

14. дсРНК по любому из пп. 7-9, где по меньшей мере одна из модификаций в нуклеотидах представляет собой нарушающую термостабильность модификацию нуклеотида.

15. дсРНК по п. 14, где нарушающая термостабильность модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из модификации с удалением азотистого основания; ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в дуплексе и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, незапертых нуклеиновых кислот (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

16. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-15, где длина двухнитевого участка составляет 19-21 нуклеотид.

17. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-16, где длина двухнитевого участка составляет 21 нуклеотид.

18. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-17, где длина каждой нити независимо составляет не более чем 30 нуклеотидов.

19. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-18, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

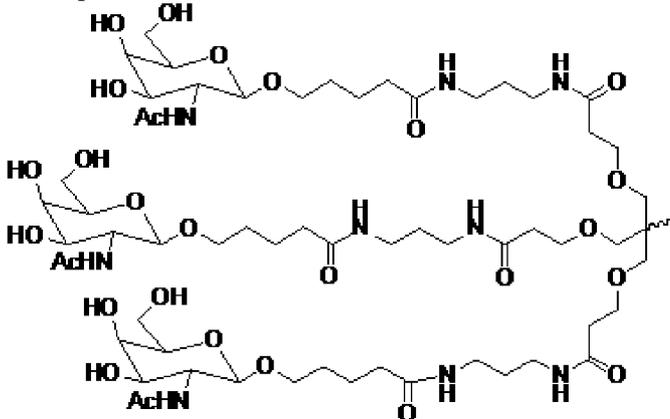
20. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-18, где по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

21. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-20, дополнительно содержащее лиганд.

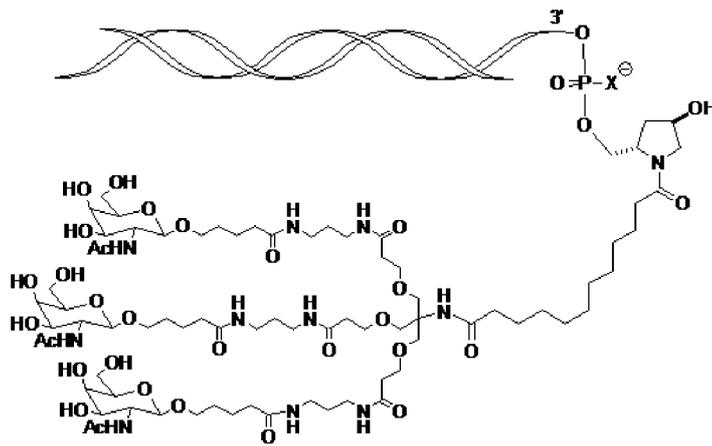
22. Средство на основе дсРНК по п. 21, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити средства на основе дсРНК.

23. Средство на основе дсРНК по п. 21 или п. 22, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

24. Средство на основе дсРНК по п. 23, где лиганд представляет собой



25. Средство на основе дсРНК по п. 24, где средство на основе дсРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

26. Средство на основе дсРНК по п. 25, где X представляет собой O.

27. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-5, где антисмысловая нить содержит участок комплементарности с мРНК, кодирующей AGT человека, где участок комплементарности содержит по меньшей мере 19 нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

28. Средство на основе дсРНК по п. 27, где антисмысловая нить содержит участок комплементарности с мРНК, кодирующей AGT человека, где участок комплементарности содержит любую из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

29. Средство на основе дсРНК по п. 28, где участок комплементарности состоит из одной из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637,

AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.

30. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 27-29, где антисмысловая нить содержит химически модифицированную нуклеотидную последовательность из дуплекса, выбранного из группы, состоящей из **AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.**

31. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 27-29, где антисмысловая нить и смысловая нить содержат химически модифицированные нуклеотидные последовательности из дуплекса, **выбранного из группы, состоящей из AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 и AD-133385.**

32. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-31, где длина двухнитевого участка составляет 19-30 пар нуклеотидов.

33. Средство на основе дсРНК по п. 32, где длина двухнитевого участка составляет 19-25 пар нуклеотидов.

34. Средство на основе дсРНК по п. 32, где длина двухнитевого участка составляет 23-27 пар нуклеотидов.

35. Средство на основе дсРНК по п. 32, где длина двухнитевого участка составляет 19-23 пары нуклеотидов.

36. Средство на основе дсРНК по п. 32, где длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

37. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-36, где длина каждой нити независимо составляет 19-30 нуклеотидов.

38. Средство на основе дсРНК по п. 21, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством одновалентного, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

39. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-38, где средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

40. Средство на основе дсРНК по п. 39, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити.

41. Средство на основе дсРНК по п. 40, где нить представляет собой антисмысловую нить.
42. Средство на основе дсРНК по п. 40, где нить представляет собой смысловую нить.
43. Средство на основе дсРНК по п. 39, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити.
44. Средство на основе дсРНК по п. 43, где нить представляет собой антисмысловую нить.
45. Средство на основе дсРНК по п. 43, где нить представляет собой смысловую нить.
46. Средство на основе дсРНК по п. 39, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити.
47. Средство на основе дсРНК по п. 46, где нить представляет собой антисмысловую нить.
48. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-47, где пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой нити дуплекса представляет собой пару оснований АУ.
49. Средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-48, где смысловая нить имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая нить имеет в общей сложности 23 нуклеотида.
50. Клетка, содержащая средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-49.
51. Фармацевтическая композиция для подавления экспрессии гена, кодирующего АГТ, содержащая средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-49.
52. Фармацевтическая композиция, содержащая средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-49 и липидный состав.
53. Способ подавления экспрессии гена АГТ в клетке, причем способ предусматривает приведение клетки в контакт со средством на основе дсРНК по любому из пп. 1-49 или фармацевтической композицией по п. 51 или п. 52, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена АГТ в клетке.
54. Способ по п. 53, где клетка находится в организме субъекта.
55. Способ по п. 54, где субъектом является человек.
56. Способ по п. 55, где у субъекта было диагностировано нарушение, ассоциированное с АГТ.
57. Способ по п. 56, где нарушение, ассоциированное с АГТ, выбрано из группы, состоящей из высокого кровяного давления, гипертензии, пограничной гипертензии, первичной гипертензии, вторичной гипертензии, изолированной систолической или диастолической гипертензии, ассоциированной с беременностью гипертензии, диабетической гипертензии, резистентной гипертензии, рефрактерной гипертензии, пароксизмальной гипертензии, реноваскулярной гипертензии, гипертензии Гольдблатта, гипертензии, ассоциированной с низкой активностью ренина в плазме крови или низкой

концентрацией ренина в плазме крови, глазной гипертензии, глаукомы, легочной гипертензии, портальной гипертензии, системной венозной гипертензии, систолической гипертензии, лабильной гипертензии; гипертензивной болезни сердца, гипертензивной нефропатии, атеросклероза, артериосклероза, васкулопатии, диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии, диабетической сердечной миопатии, гломерулосклероза, коарктации аорты, аневризмы аорты, фиброза желудочка, сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, стенокардии, инсульта, заболевания почек, почечной недостаточности, системного склероза, задержки внутриутробного развития (IUGR), задержки развития плода, ожирения, стеатоза печени/жировой печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); непереносимости глюкозы, диабета 2-го типа (инсулинонезависимого диабета) и метаболического синдрома.

58. Способ по п. 56, где субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 130 мм рт. ст. или диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст.

59. Способ по п. 56, где субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 140 мм рт. ст. и диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст.

60. Способ по п. 56, где субъект является частью группы, предрасположенной к развитию солечувствительности, имеет излишний вес, имеет ожирение или является беременной женщиной.

61. Способ по любому из пп. 53-60, где приведение клетки в контакт со средством на основе дсРНК подавляет экспрессию AGT на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%.

62. Способ по любому из пп. 53-60, где подавление экспрессии AGT приводит к снижению уровня белка AGT в сыворотке крови субъекта на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

63. Способ лечения нарушения, ассоциированного с AGT, у субъекта, предусматривающий введение субъекту средства на основе дсРНК по любому из пп. 1-49 или фармацевтической композиции по п. 51 или п. 52, за счет чего осуществляется лечение нарушения, ассоциированного с AGT, у субъекта.

64. Способ по п. 63, где субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 130 мм рт. ст. или диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст.

65. Способ по п. 63, где субъект имеет систолическое кровяное давление по меньшей мере 140 мм рт. ст. и диастолическое кровяное давление по меньшей мере 80 мм рт. ст.

66. Способ по п. 63, где субъектом является человек.

67. Способ по п. 63, где субъект является частью группы, предрасположенной к развитию солечувствительности, имеет излишний вес, имеет ожирение или является беременной женщиной.

68. Способ по любому из пп. 56-67, где средство на основе дсРНК вводят субъекту в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

69. Способ по любому из пп. 56-67, где средство на основе дсРНК вводят субъекту

подкожно.

70. Способ по любому из пп. 56-69, дополнительно предусматривающий определение уровня АГТ в образце(-ах) от субъекта.

71. Способ по п. 70, где уровень АГТ в образце(-ах) от субъекта представляет собой уровень белка АГТ в образце(-ах) крови, образце(-ах) сыворотки крови или образце(-ах) мочи.

72. Способ по любому из пп. 56-71, дополнительно предусматривающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства для лечения гипертензии.

73. Способ по п. 72, где дополнительное терапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из диуретика, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), антагониста рецептора ангиотензина II, бета-блокатора, вазодилататора, блокатора кальциевых каналов, антагониста альдостерона, альфа2-агониста, ингибитора ренина, альфа-блокатора, адренергического средства периферического действия, селективного частичного агониста рецептора D1, неселективного антагониста альфа-адренергических рецепторов, синтетического, стероидного антиминералокортикоидного средства, ингибитора рецептора ангиотензина-неприлизина (ARNi), Entresto®, сакубитрила/валсартана, или антагониста рецептора эндотелина (ERA), ситаксентана, амбрисентана, атрасентана, BQ-123, зиботентана, босентана, мацитентана и тезосентана, комбинации любого из вышеперечисленных, а также гипотензивного терапевтического средства, составленного в виде комбинации средств.

74. Способ по п. 72, где дополнительное терапевтическое средство содержит антагонист рецептора ангиотензина II.

75. Способ по п. 74, где антагонист рецептора ангиотензина II выбран из группы, состоящей из лозартана, валсартана, олмесартана, эпросартана и азилсартана.

76. Применение средства на основе дсРНК по любому из пп. 1-49 или фармацевтической композиции по п. 51 или п. 52 для лечения нарушения, ассоциированного с АГТ.

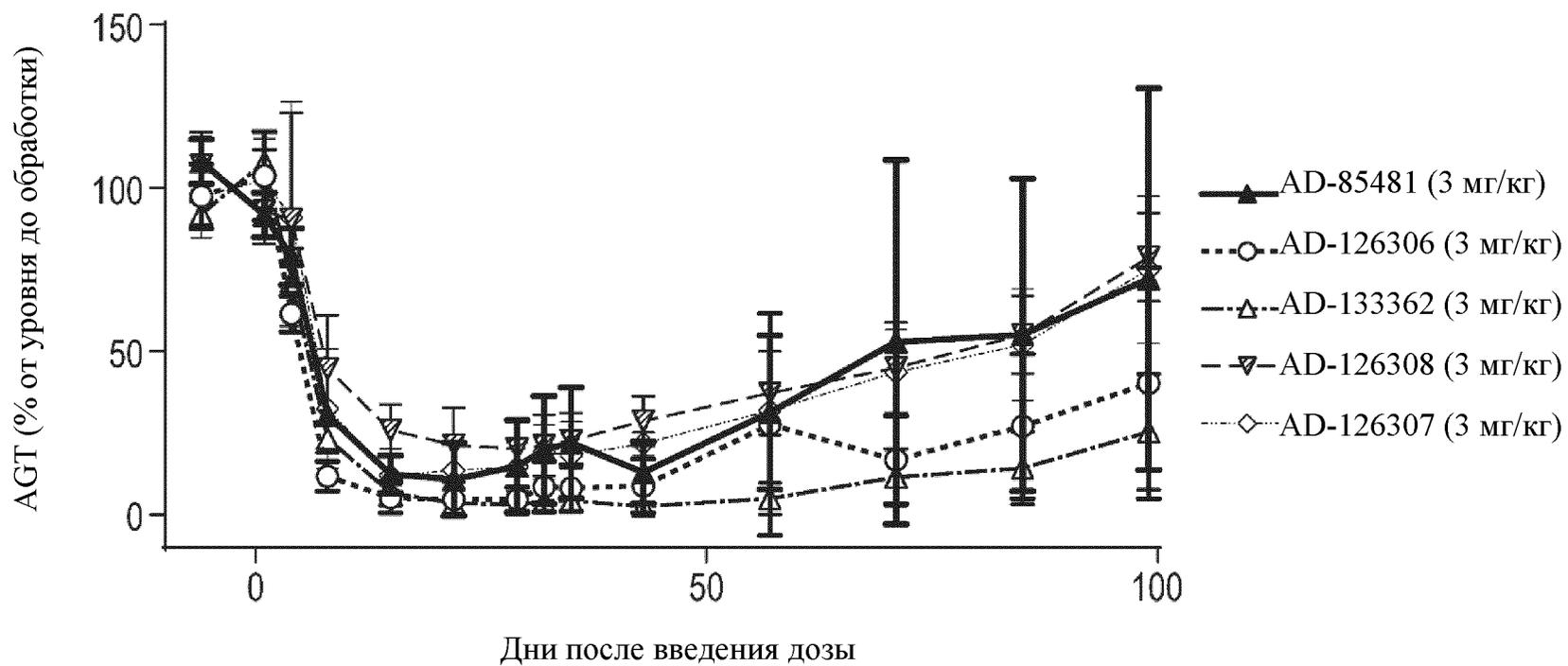
77. Применение по п. 76 в любом из способов по пп. 54-75.

78. Набор, содержащий средство на основе дсРНК по любому из пп. 1-49 или фармацевтическую композицию по п. 51 или п. 52.

По доверенности

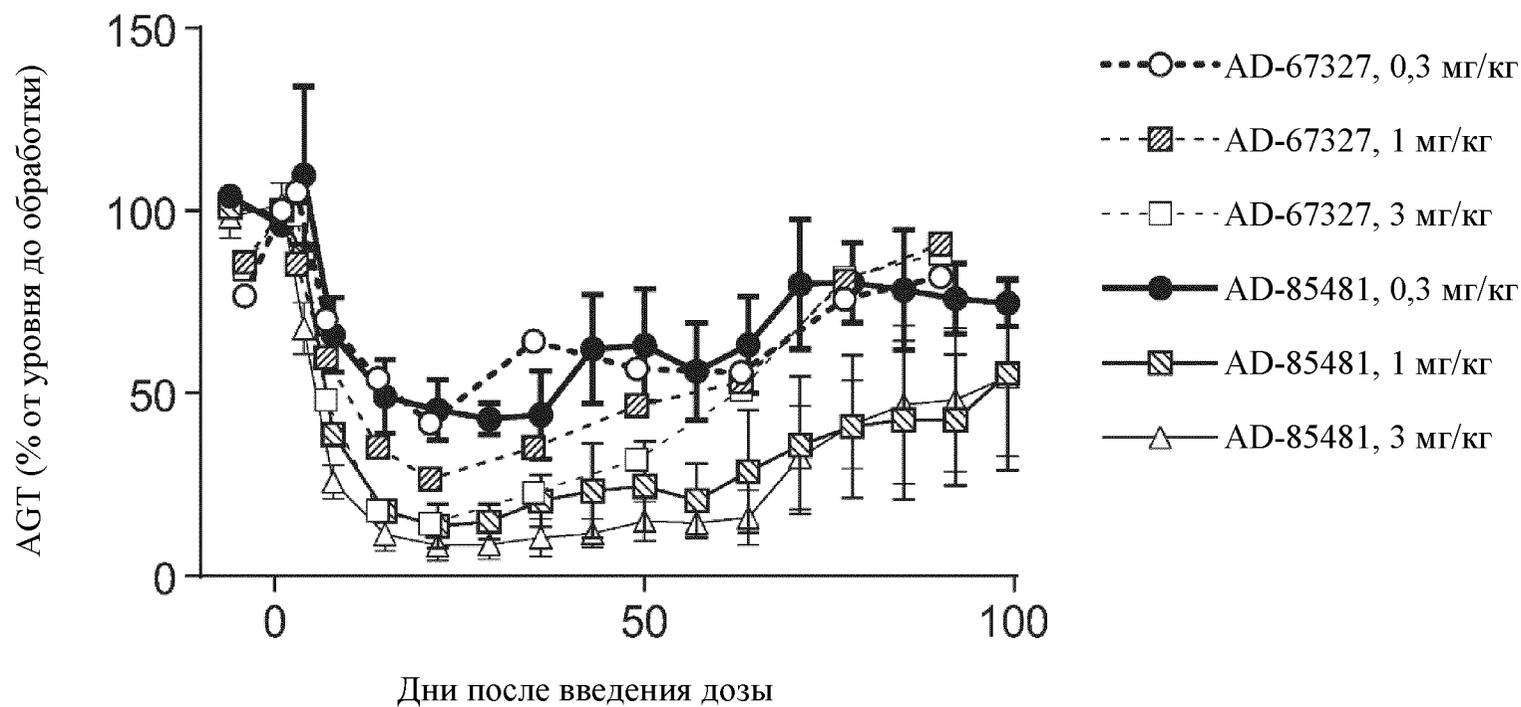
ФИГ. 1А

Однократная доза (NHP)



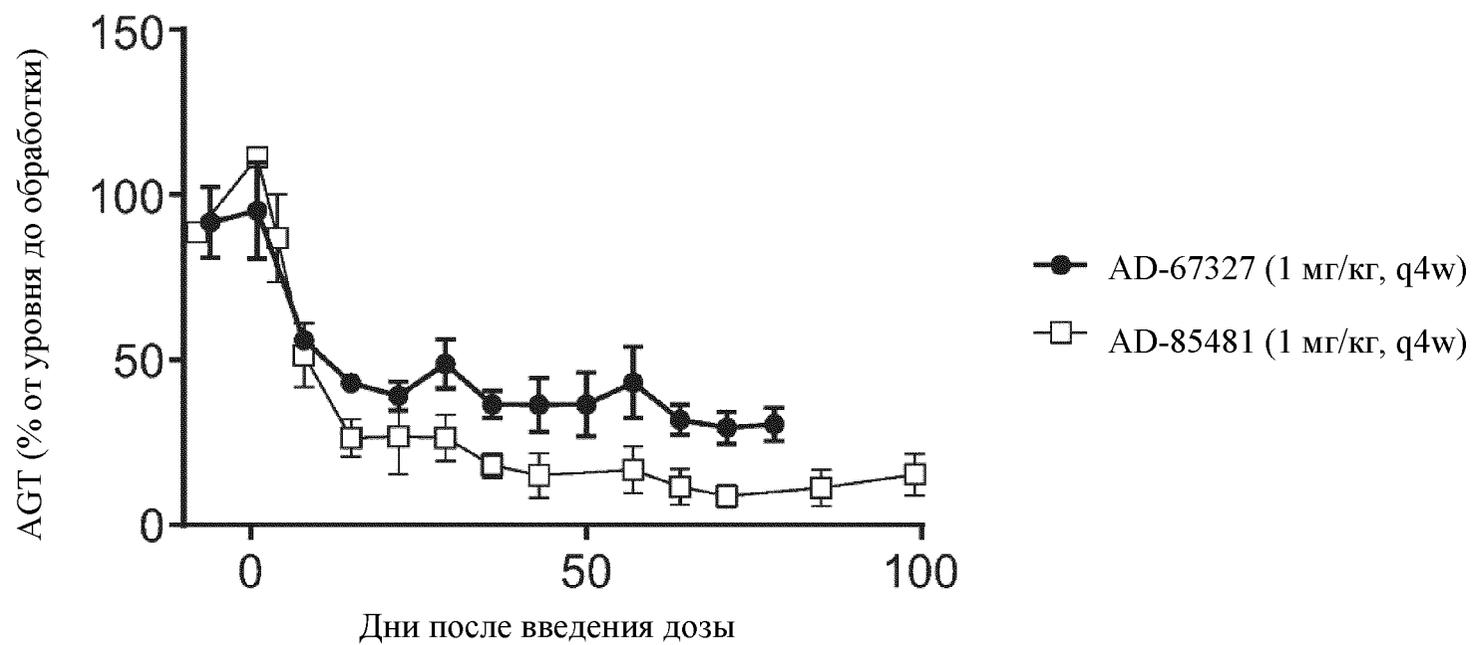
**ФИГ. 1В**

Сравнение AD-67327 и AD-85481

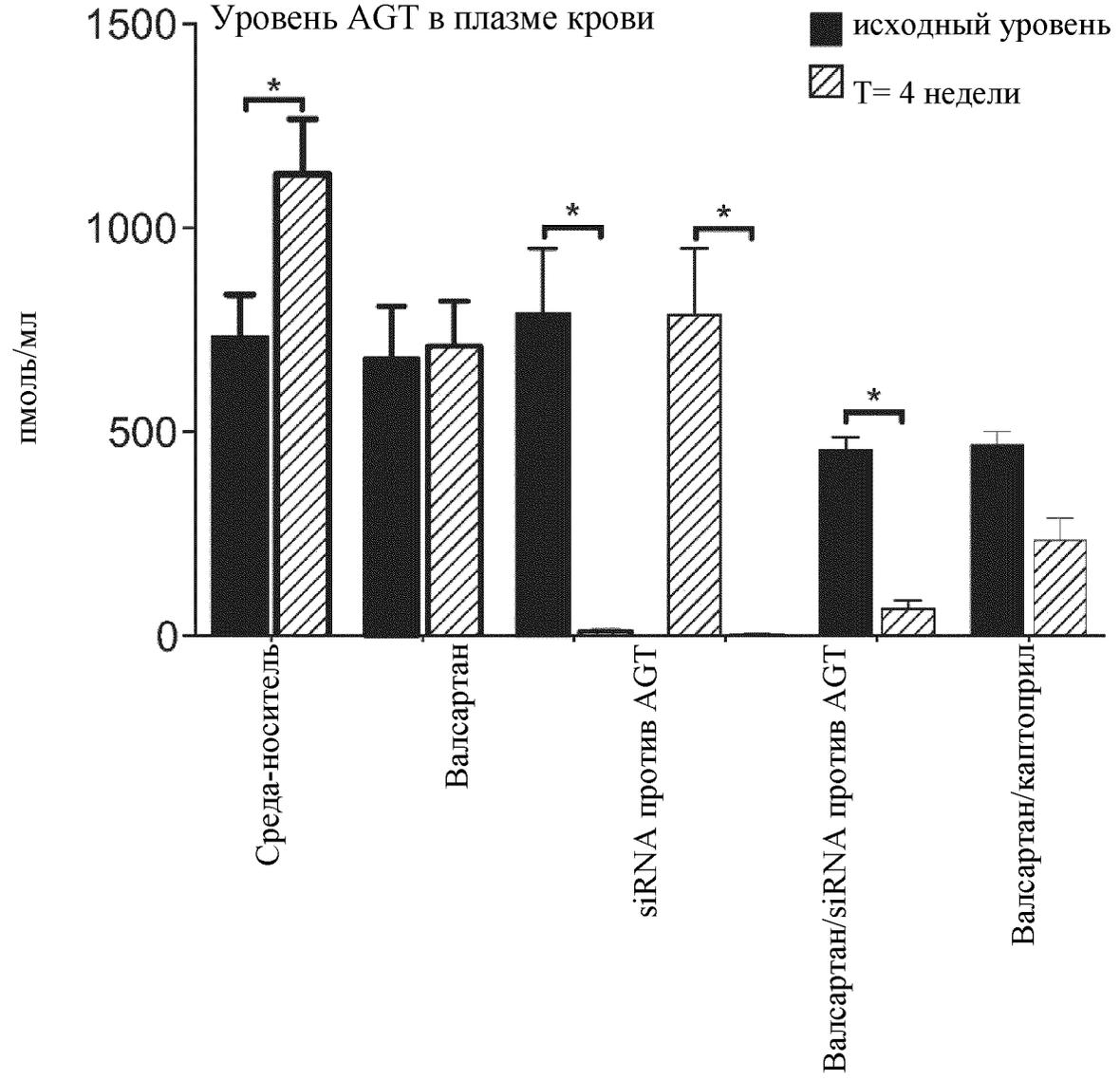


ФИГ. 1С

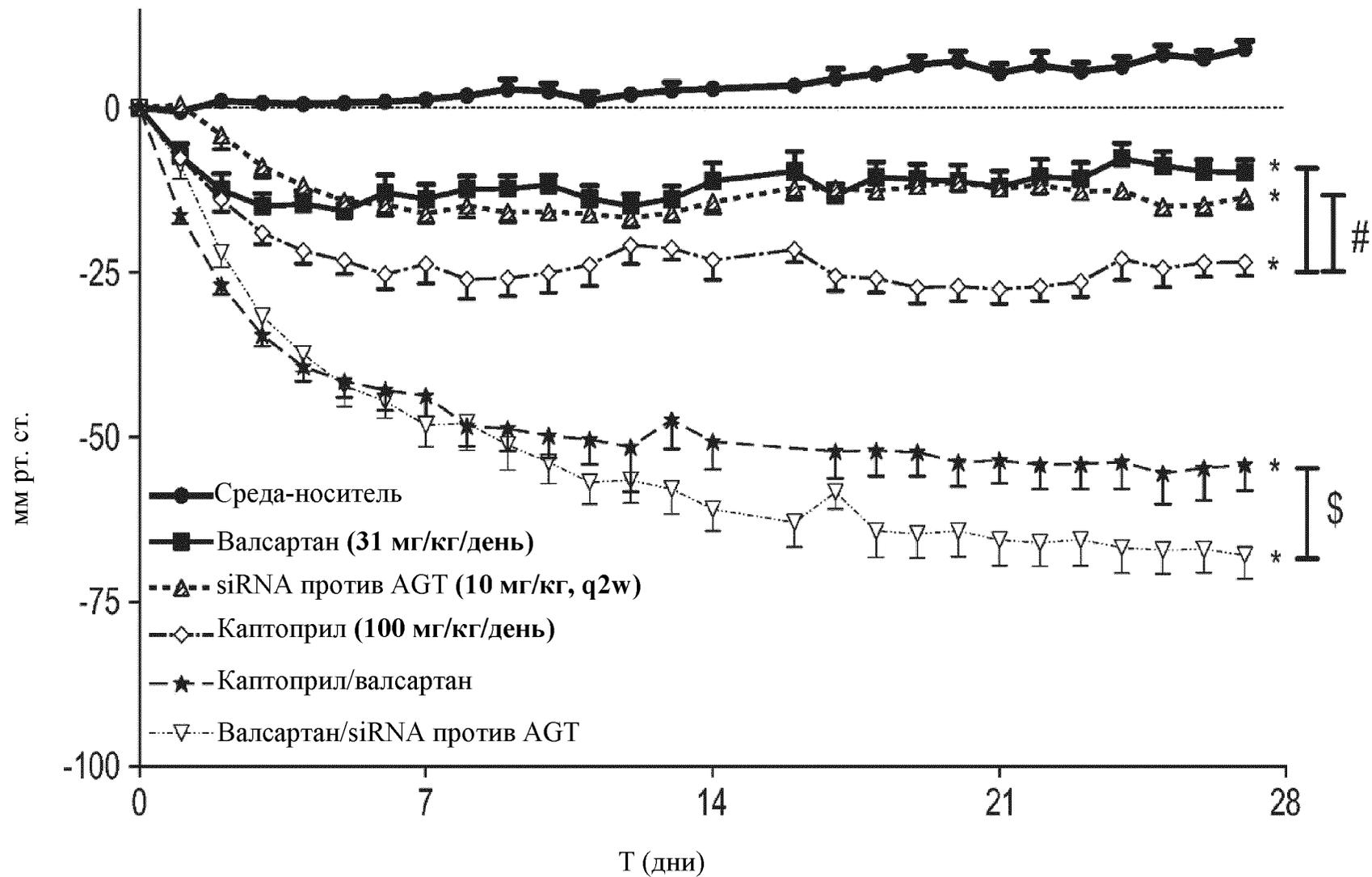
Сравнение AD-67327 и AD-85481  
Повторное введение доз



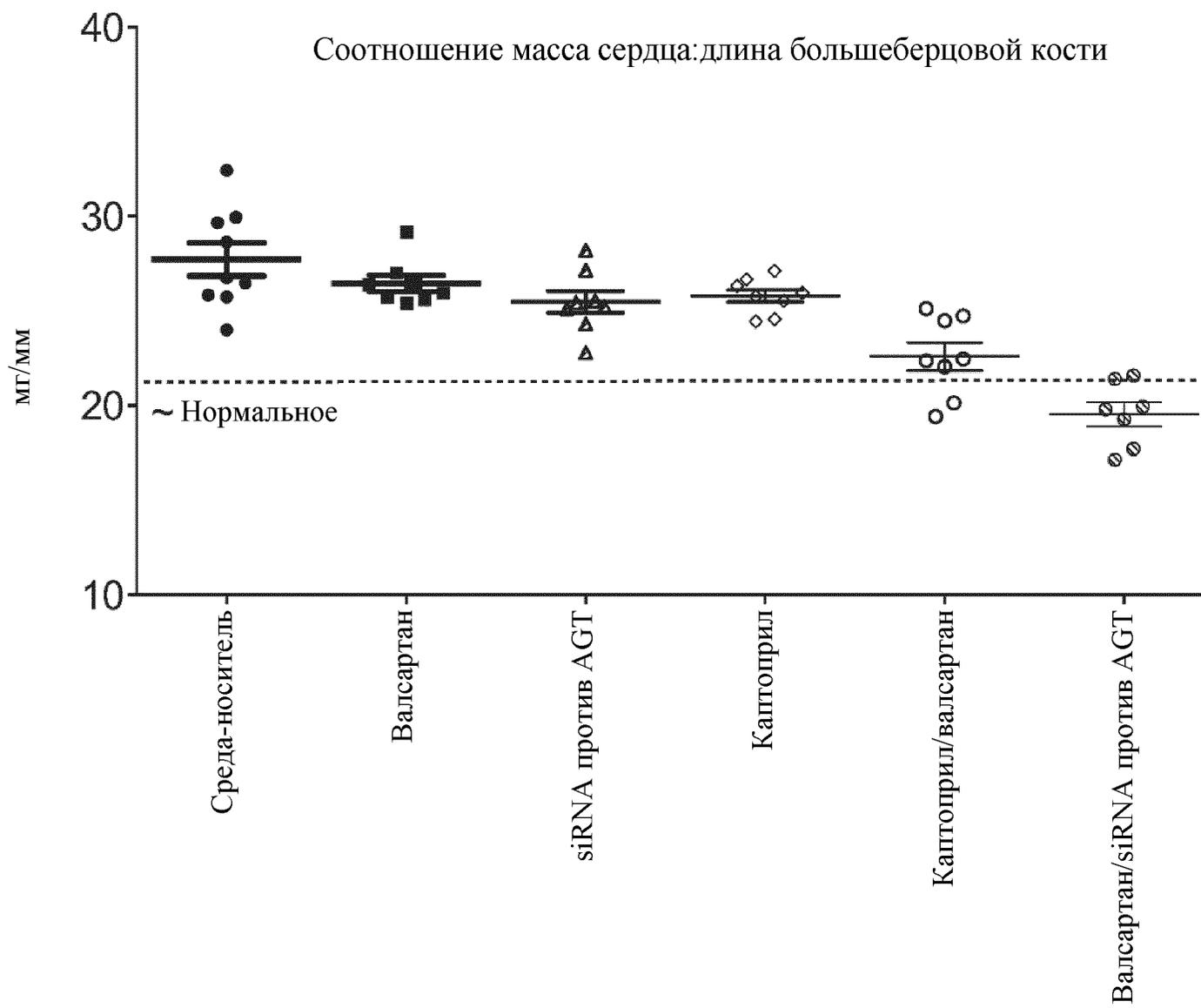
ФИГ. 2А



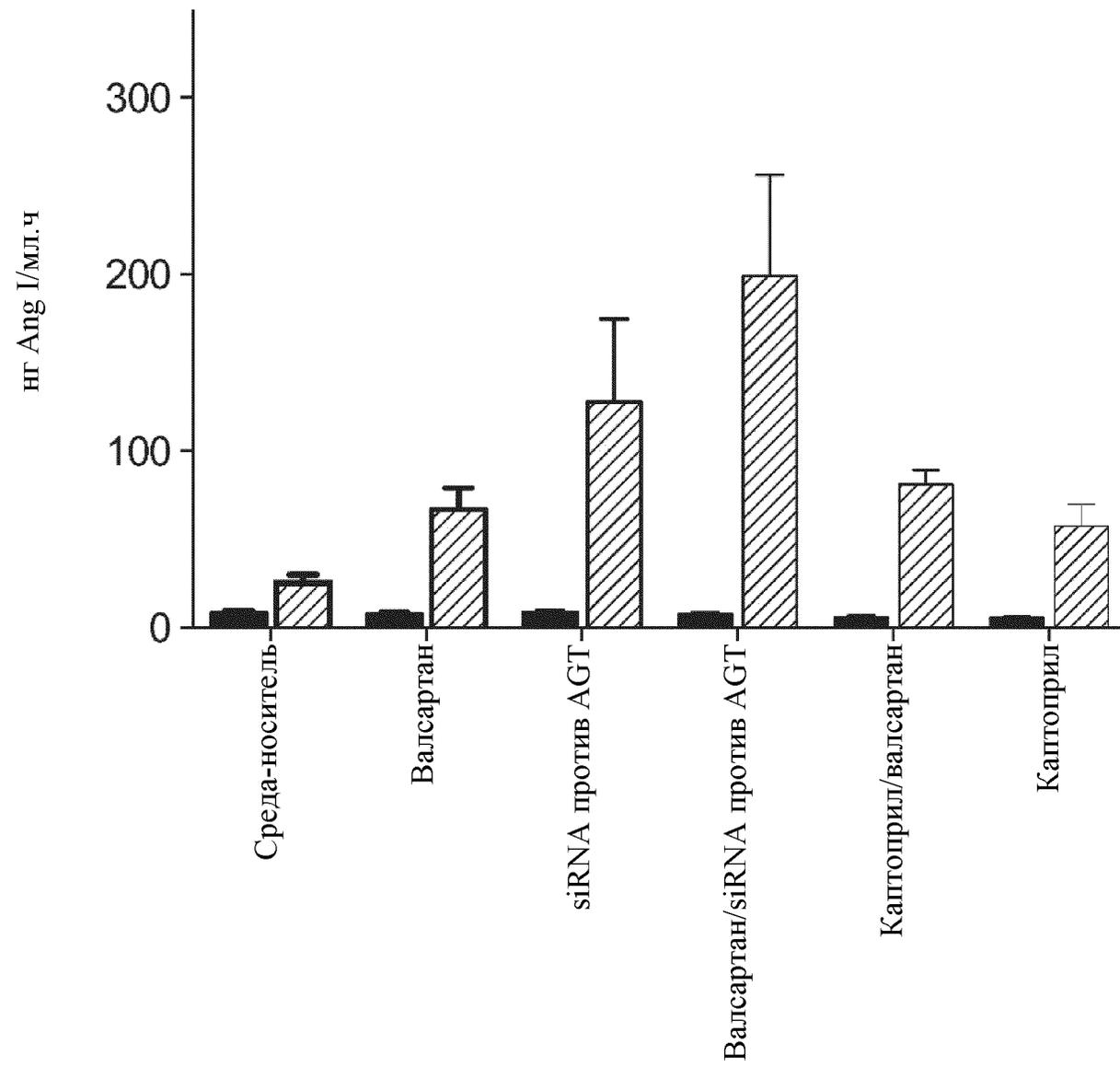
ФИГ. 2В



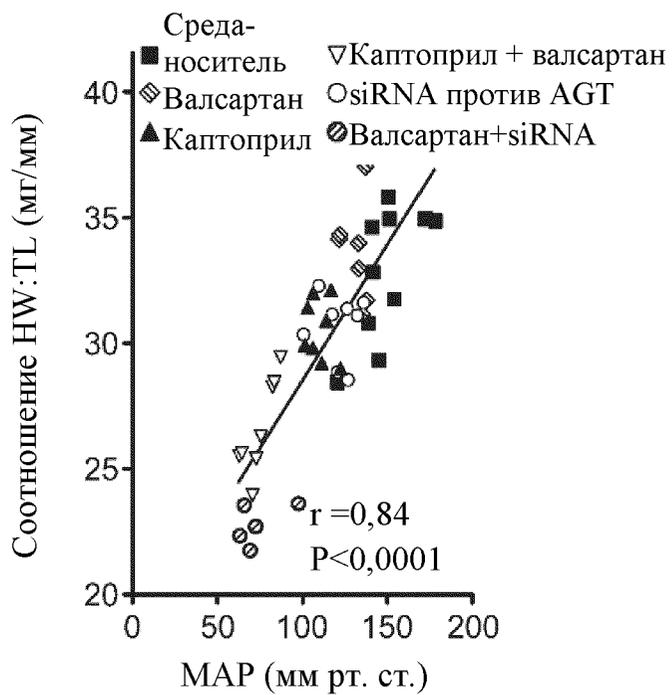
ФИГ. 2С



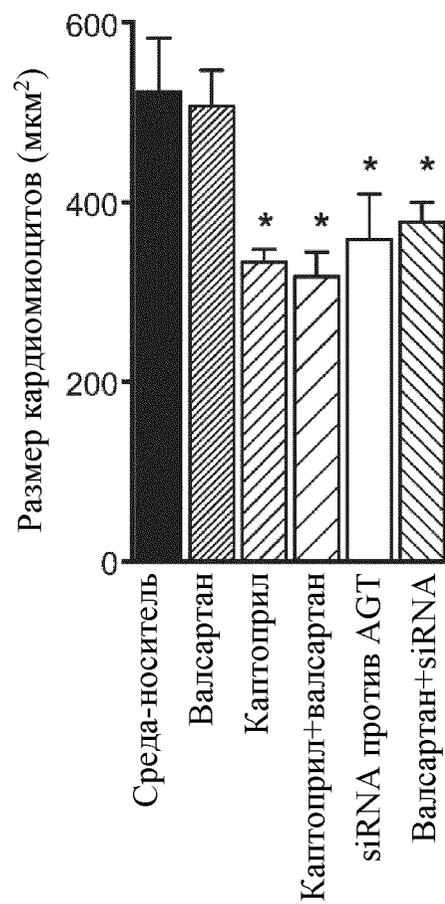
ФИГ. 2D



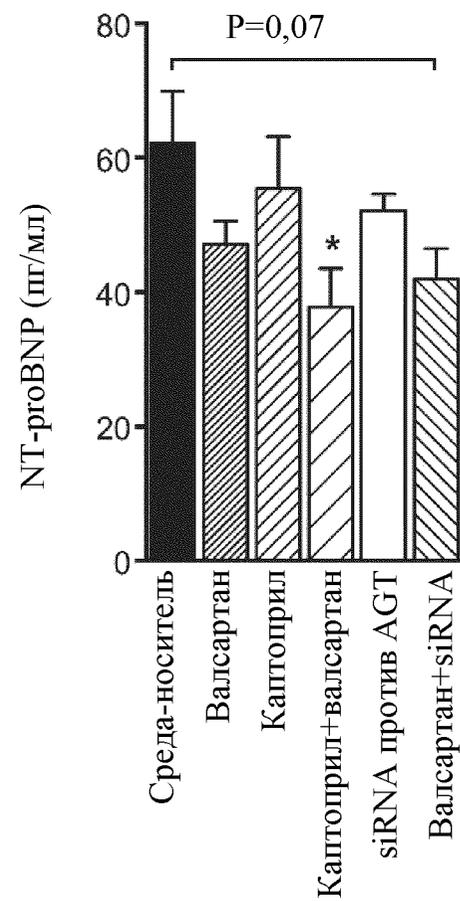
**ФИГ. 2Е**



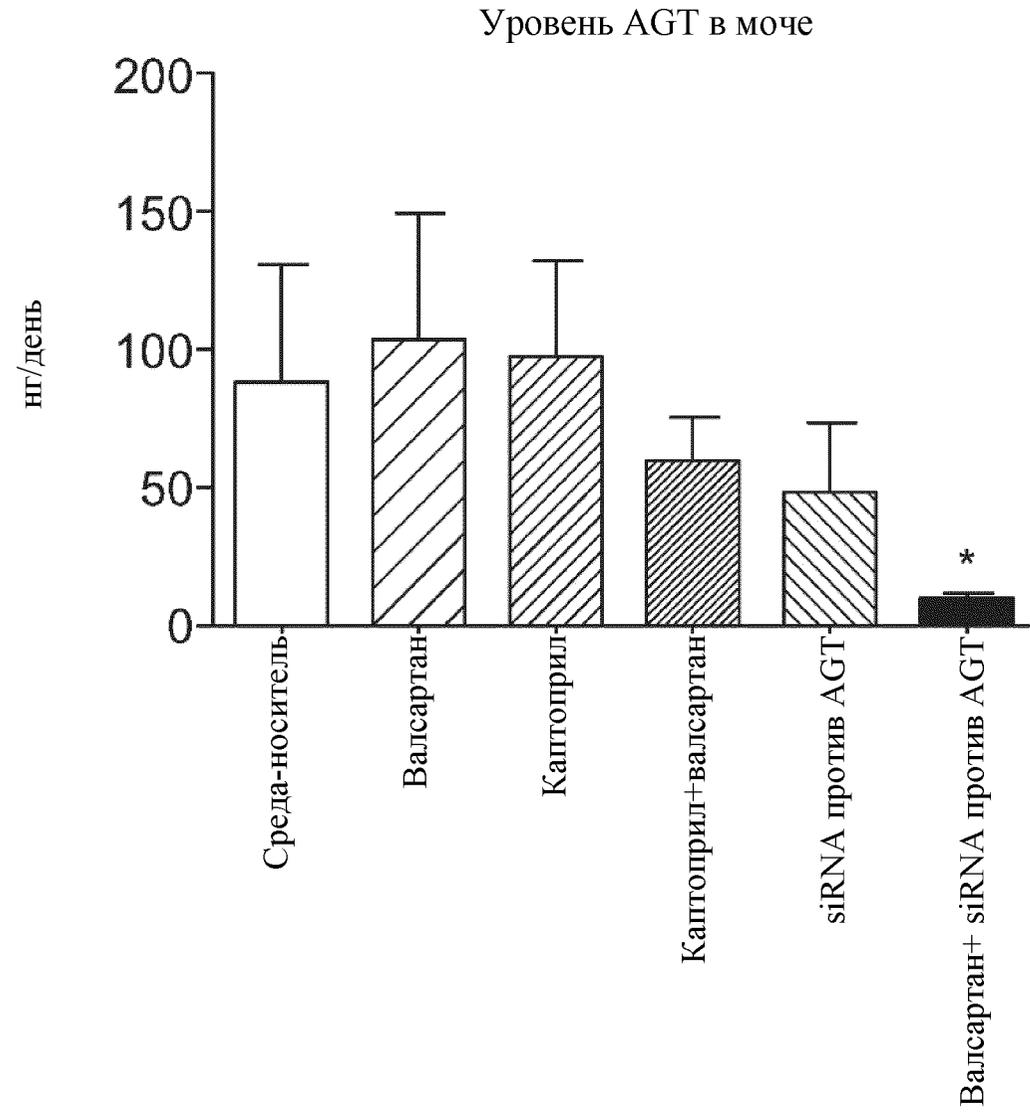
**ФИГ. 2F**



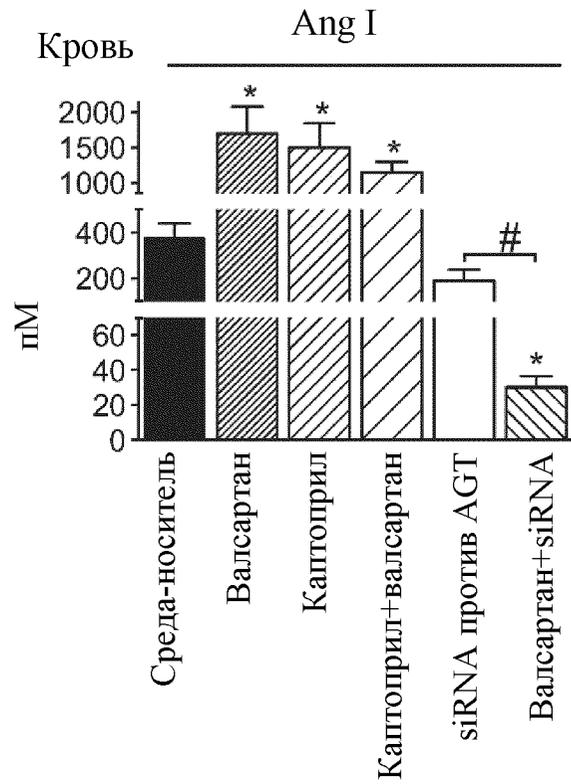
**ФИГ. 2G**



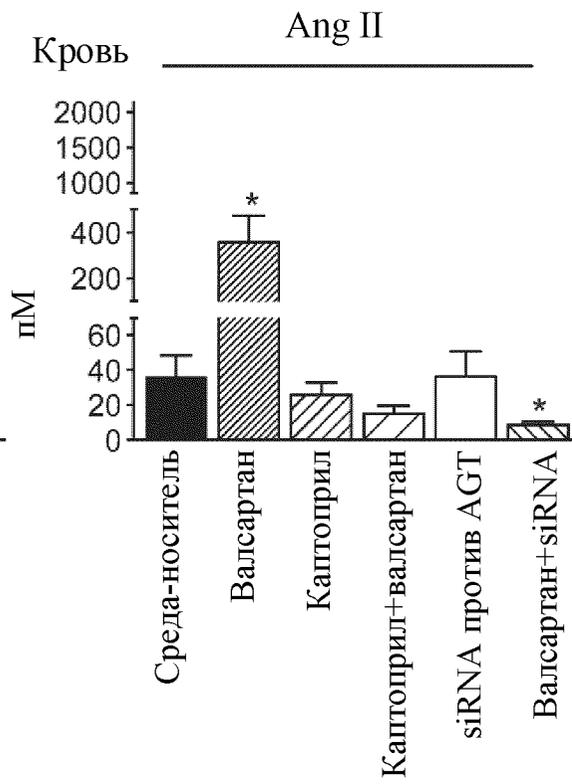
ФИГ. 3



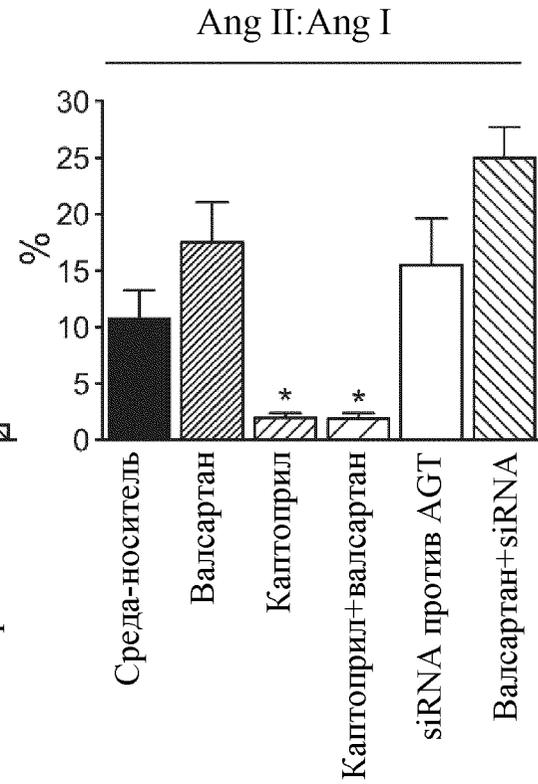
**ФИГ. 4А**



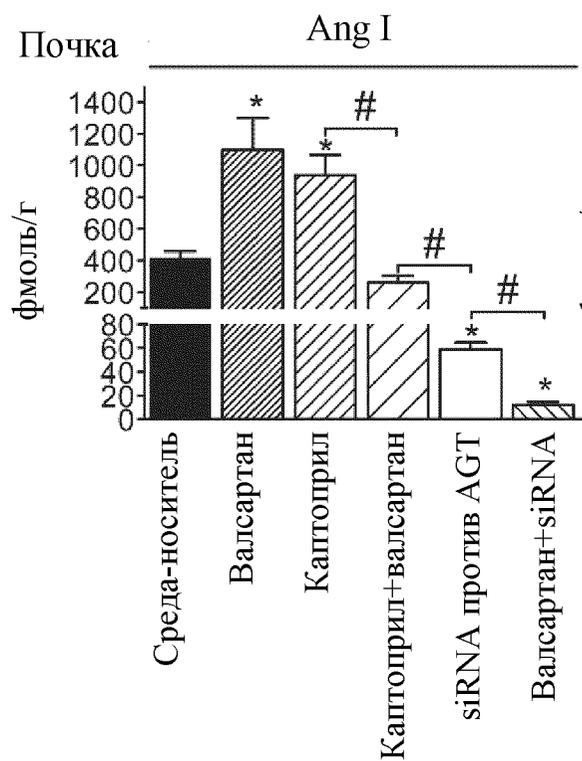
**ФИГ. 4В**



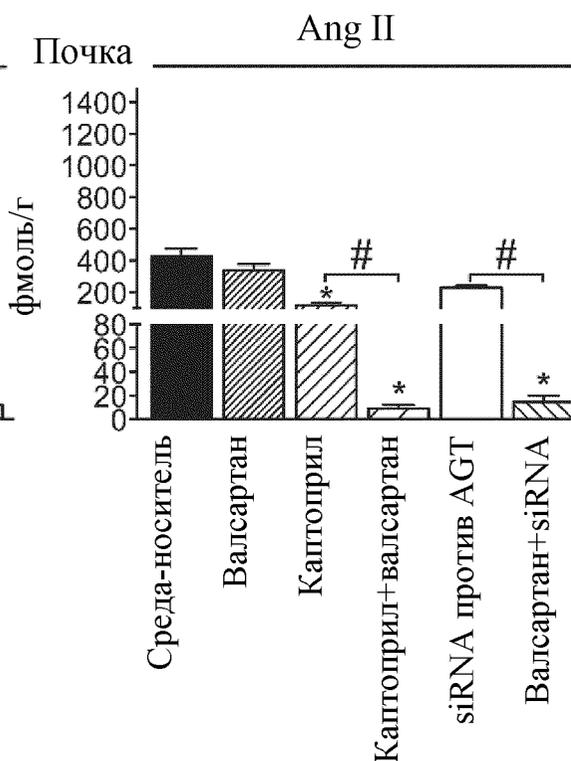
**ФИГ. 4С**



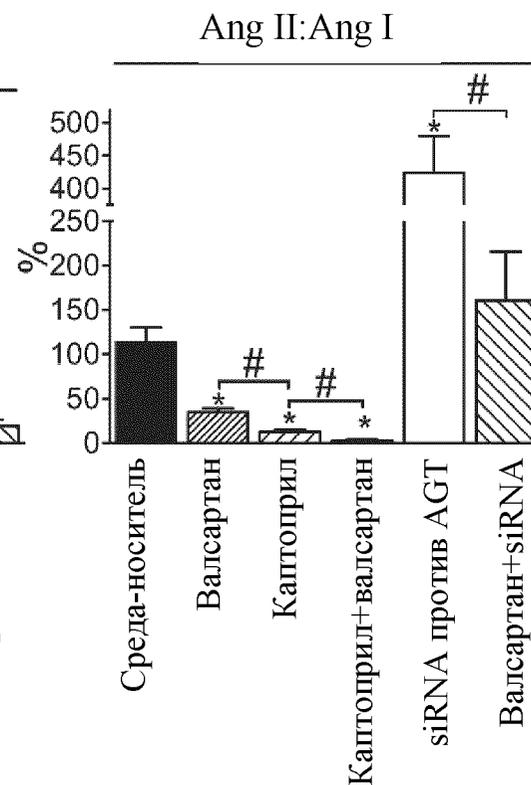
ФИГ. 5А



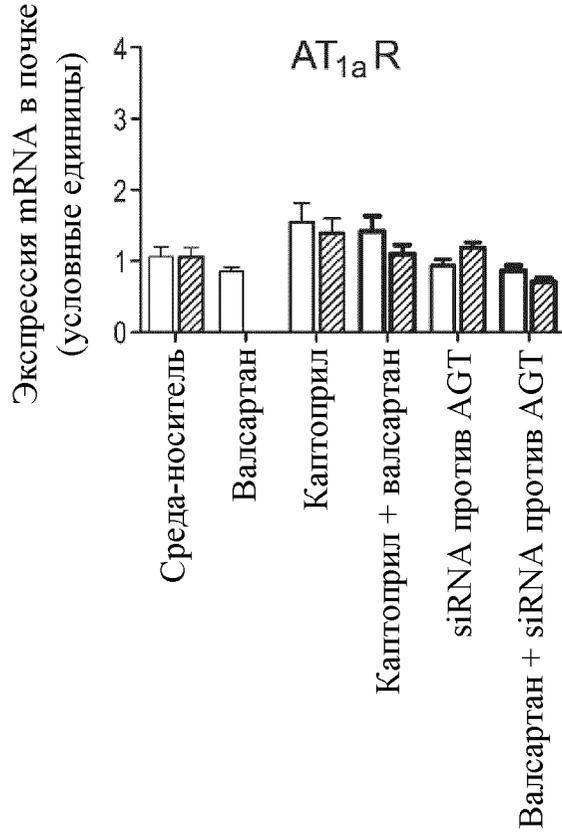
ФИГ. 5В



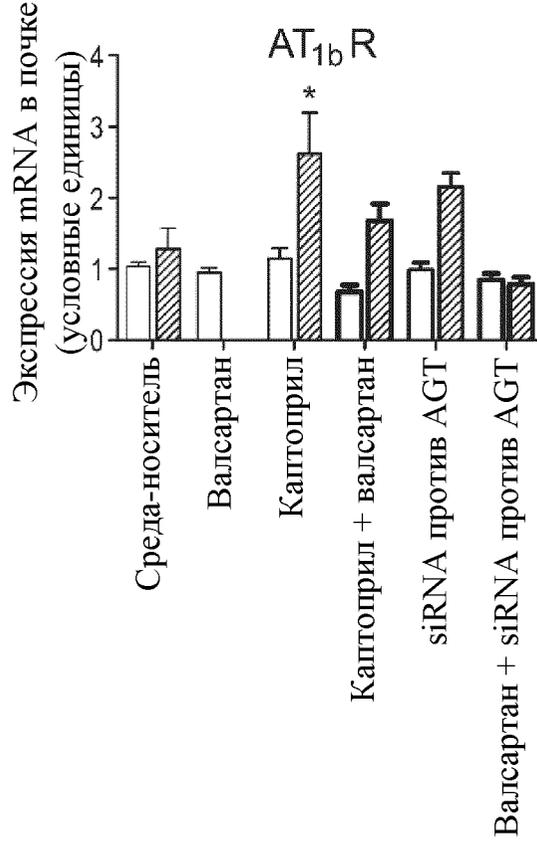
ФИГ. 5С



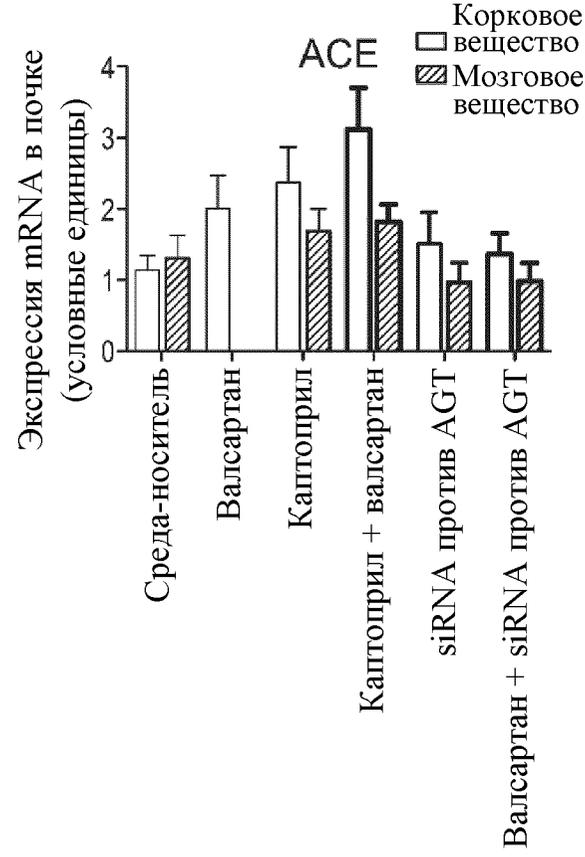
ФИГ. 6А



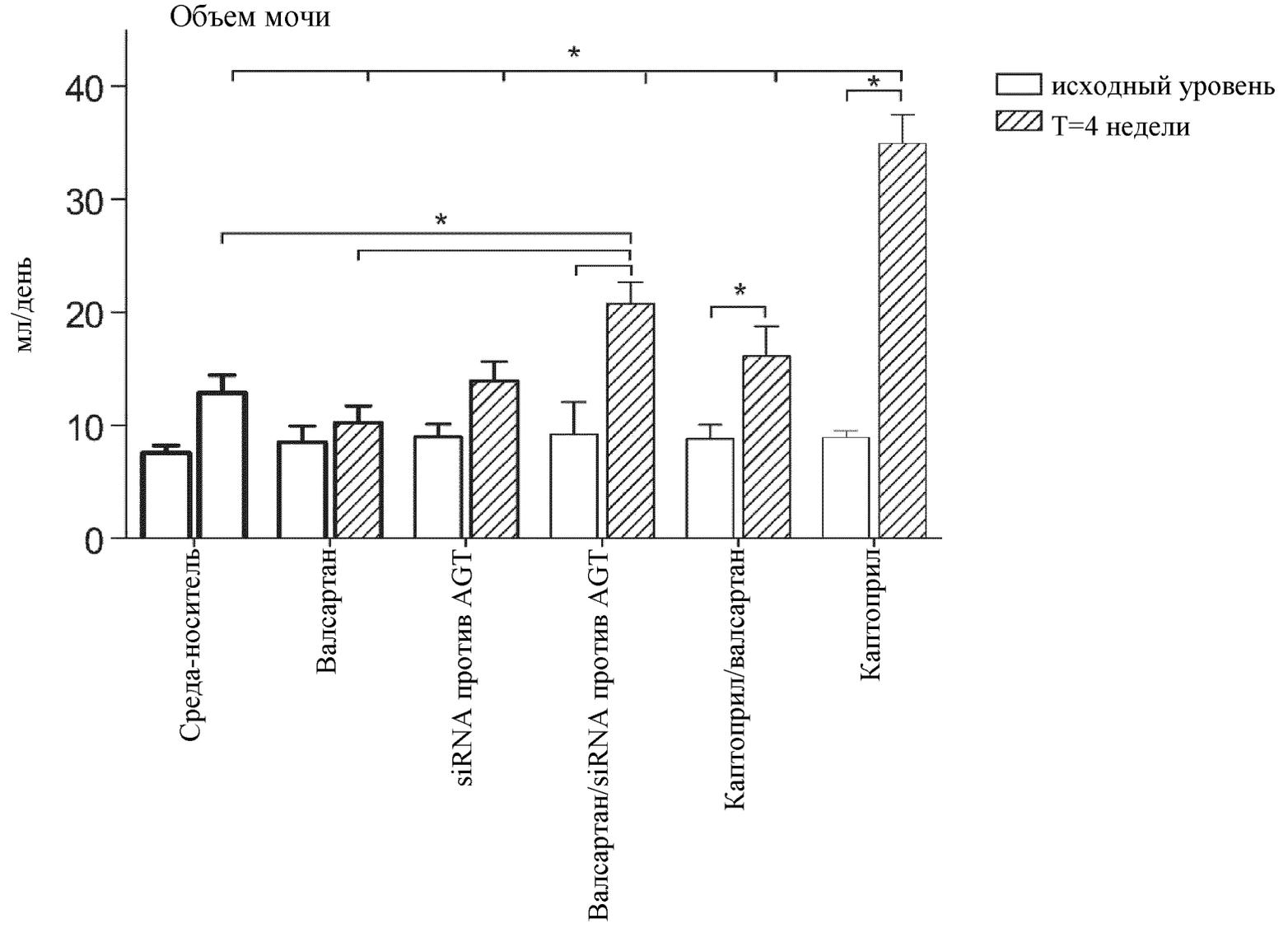
ФИГ. 6В



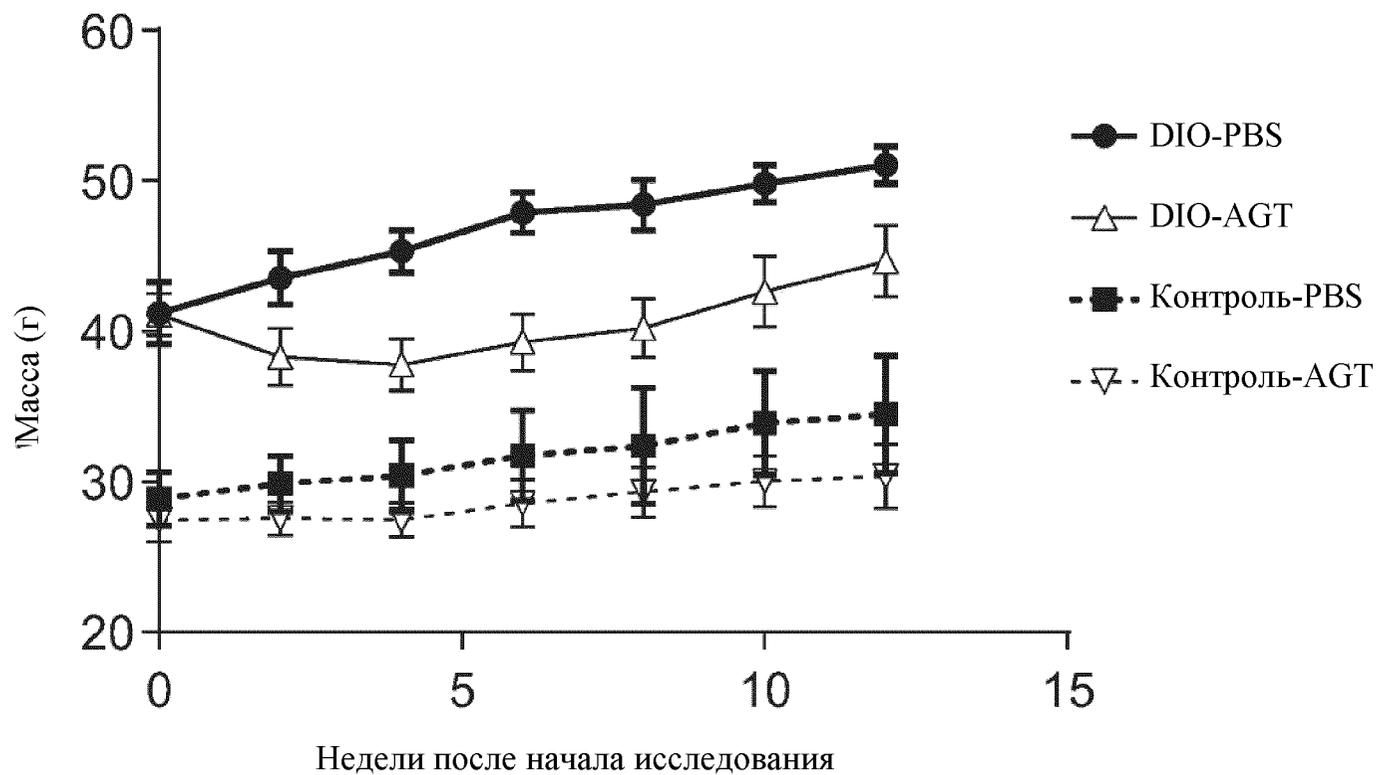
ФИГ. 6С



ФИГ. 7

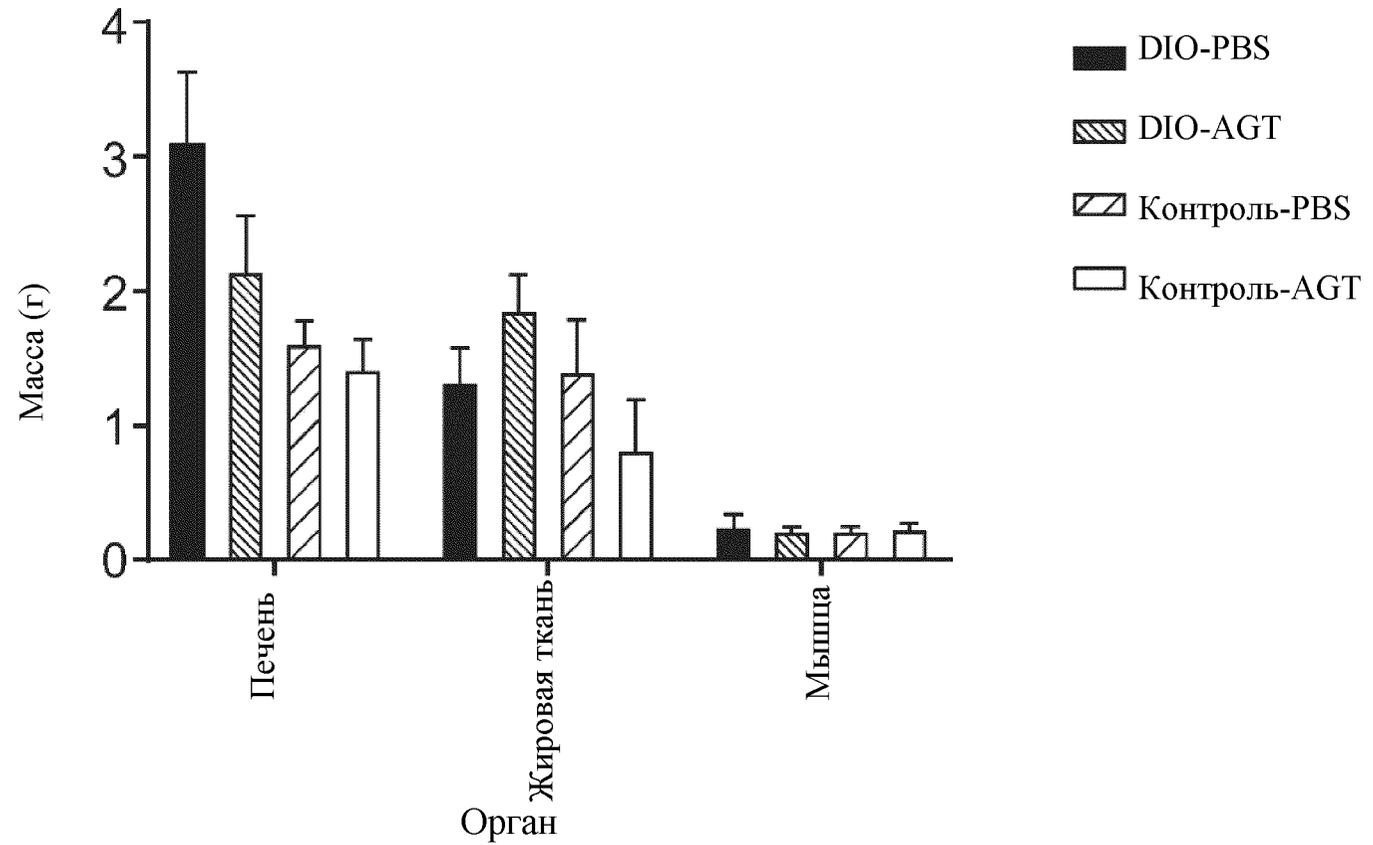


Воздействие сайленсинга AGT на прирост массы у мышей DIO



ФИГ. 8А

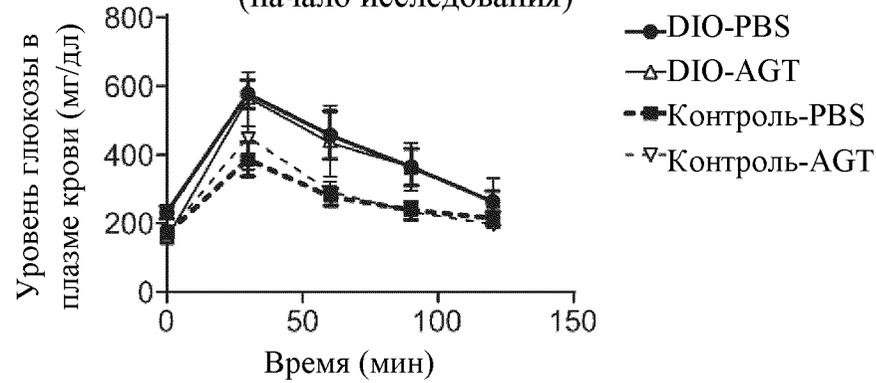
Масса органов у мышей DIO через 12 недель  
после начала исследования



ФИГ. 8В

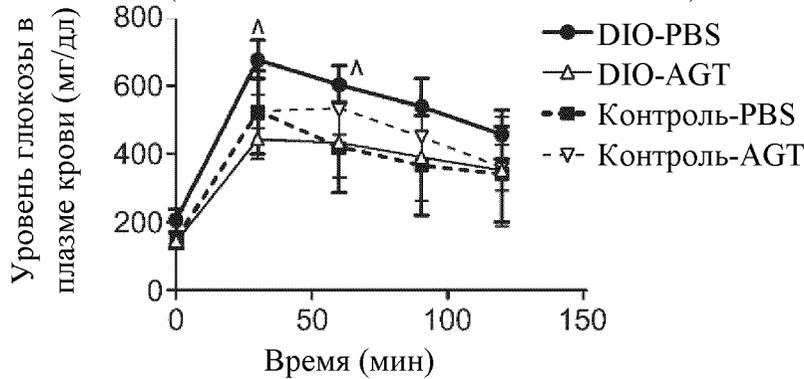
**ФИГ. 9А**

Воздействие сайленсинга AGT на  
переносимость глюкозы у мышей DIO  
(начало исследования)



**ФИГ. 9В**

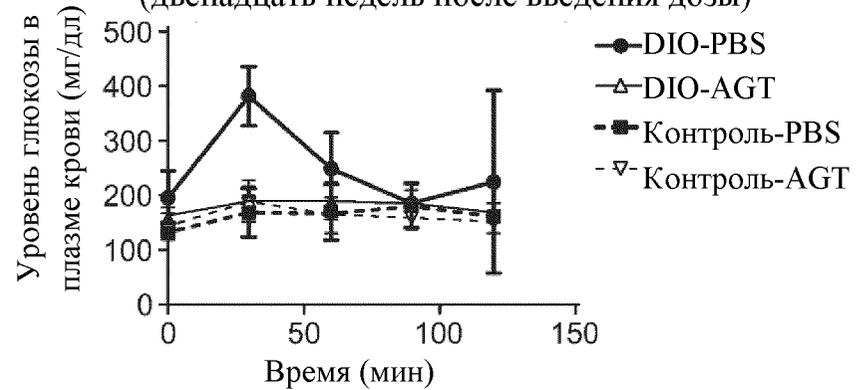
Воздействие сайленсинга AGT на  
переносимость глюкозы у мышей DIO  
(шесть недель после введения дозы)



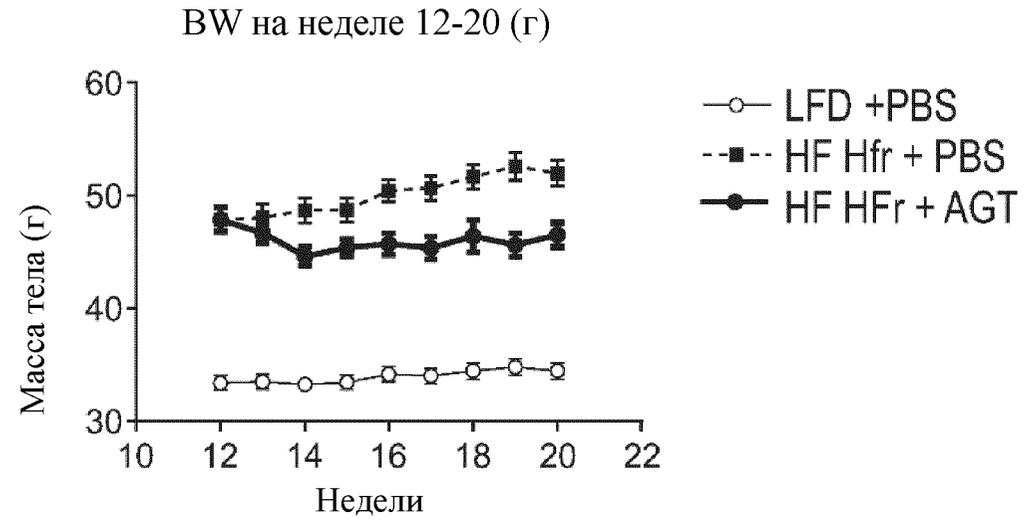
<sup>Λ</sup>обозначает(-ют) значение(-я) выше максимума средства измерения (699)

**ФИГ. 9С**

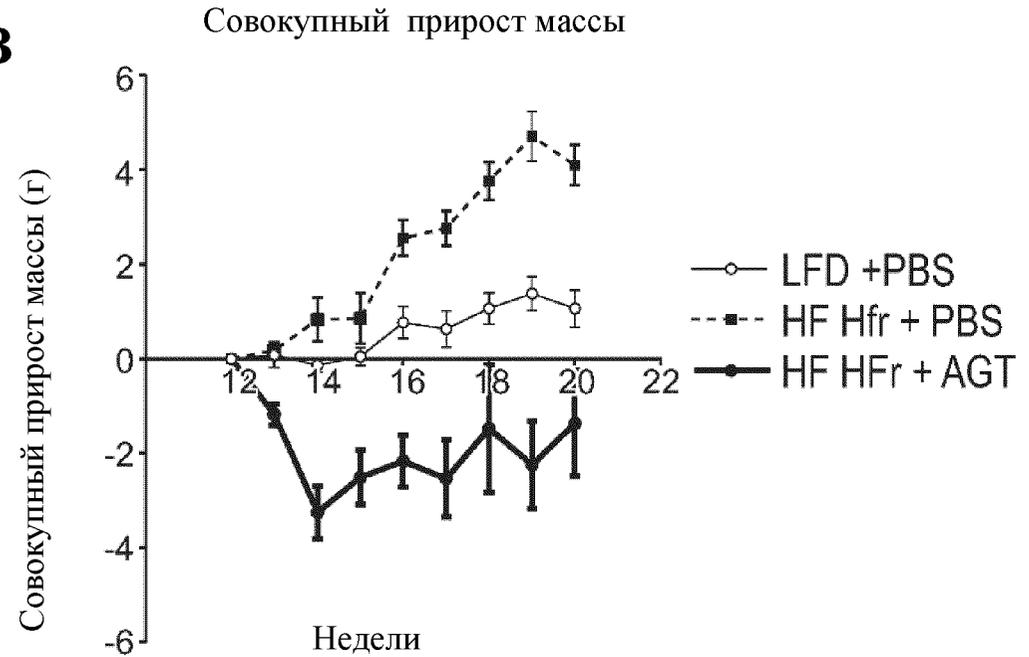
Воздействие сайленсинга AGT на  
переносимость глюкозы у мышей DIO  
(двенадцать недель после введения дозы)



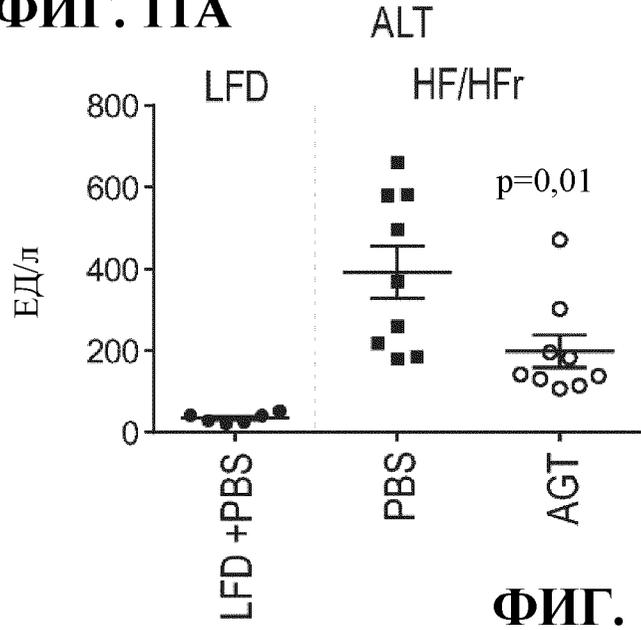
**ФИГ. 10А**



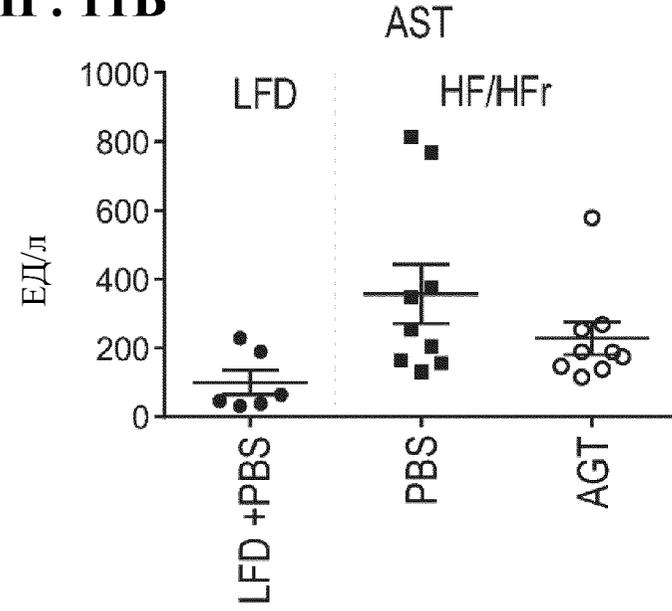
**ФИГ. 10В**



**ФИГ. 11А**



**ФИГ. 11В**



**ФИГ. 11С**

