(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191721 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.09

(22) Дата подачи заявки
2019.12.19

(51) Int. Cl. ***C12N 15/113*** (2010.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СРЕДСТВА ДЛЯ RNAi В ОТНОШЕНИИ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА (APP) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

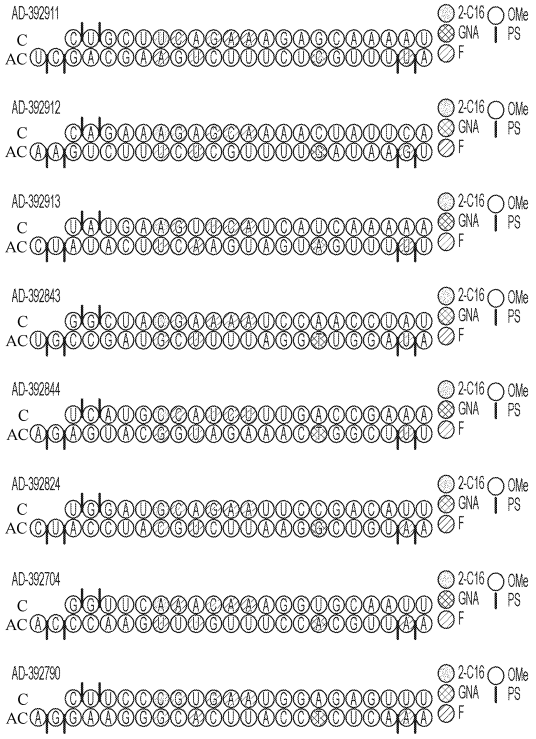
(31) **62/781,774; 62/862,472; 62/928,795**
(32) **2018.12.19; 2019.06.17; 2019.10.31**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/067449**
(87) **WO 2020/132227 2020.06.25**
(88) **2020.07.30**

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

(72) Изобретатель:
Мильштейн Стюарт, Браун Кирк, Найр Джаяпракаш, Майер Мартин, Джадхав Васант, Китинг Марк, Касторено Адам, Хаслетт Патрик, Саундарапандиан Мангала Минакши, Фицжеральд Кевин (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к средствам и композициям на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNAi), нацеливающейся на ген APP, а также к способам ингибирования экспрессии гена APP и способам лечения субъектов, имеющих ассоциированное с APP заболевание или нарушение, такое как церебральная амилоидная ангиопатия (CAA) и семейная болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD или eFAD), с помощью таких средств и композиций на основе dsRNAi.



202191721 A1

202191721 A1

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ СРЕДСТВА ДЛЯ RNAi В ОТНОШЕНИИ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА (APP) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к средствам для RNAi, нацеливающимся на APP, и способам, связанным с ними.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 18 декабря 2019 г., имеет название 53433_500WO01_SequenceListing_ST25.txt и ее размер составляет 632 Кбайт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ген белка-предшественника амилоида (APP) кодирует интегральный мембранный белок, экспрессируемый в нейронах и глии. Хотя основная функция APP неизвестна, расщепленные под действием секретазы формы APP – в частности, формы расщепления APP, представляющие собой Aβ, например, Aβ (1-42) (также известная как Aβ42) и Aβ (1-40) (также известная как Aβ40), обычно обнаруживаются в качестве преобладающего белка в бета-амилоидных бляшках – были давно описаны как ассоциированные с развитием и прогрессированием болезни Альцгеймера (AD) у пораженных индивидуумов. Действительно, идентификация бета-амилоидных бляшек у субъекта является необходимой для патологоанатомической диагностики AD. В частности, было описано, что формы расщепления APP, представляющие собой Aβ, играют определяющую и даже причинную роль в развитии двух связанных/ассоциированных с AD заболеваний: церебральной амилоидной ангиопатии (CAA) и семейной болезни Альцгеймера с ранним началом (EOFAD или eFAD).

Ингибирование экспрессии и/или активности APP с помощью средства, которое может селективно и эффективно ингибировать APP и за счет этого блокировать или снижать продуцирование и/или уровни форм расщепления APP, представляющих собой Aβ,

могло бы оказаться полезным для предупреждения или лечения различных ассоциированных с APP заболеваний и нарушений, включая среди прочего AD, CAA и EOFAD.

Существующие в настоящее время варианты лечения ассоциированных с APP заболеваний и нарушений являются как ограниченными, так и в значительной степени неэффективными. В настоящее время отсутствуют виды терапии наследственной CAA, и попытки лечения спорадических форм AD и EOFAD к настоящему времени оказались безуспешными – например, все испытания ингибиторов BACE1 (β-секретазы) для лечения спорадической AD пока не увенчались успехом (Egan et al. al. *The New England Journal of Medicine*, 378: 1691-1703; Hung and Fu. *Journal of Biomedical Science*, 24: 47). Между тем, целый ряд средств иммунотерапии, направленных на Aβ, находится в различных фазах разработки, в то время как целый ряд программ по разработке ингибиторов γ-секретазы человека был остановлен вследствие токсичности (Selkoe and Hardy. *EMBO Molecular Medicine*, 8: 595-608). К настоящему времени одобренные виды фармакологического лечения ассоциированных с APP заболеваний или нарушений направлены на лечение симптомов, а не на предупреждение или излечение, и такие виды лечения характеризуются ограниченной эффективностью, в частности, в ходе прогрессирования ассоциированных с APP заболеваний или нарушений у пораженного индивидуума. Следовательно, существует потребность в видах терапии для субъектов, страдающих от ассоциированных с APP заболеваний и нарушений, включая особую потребность в видах терапии для субъектов, страдающих от наследственных CAA и EOFAD.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрены композиции для RNAi, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена белка-предшественника амилоида (APP). Ген APP может находиться внутри клетки, например, внутри клетки субъекта, такого как человек. В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения композиций для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена APP и/или для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена APP, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к страданию от ассоциированного с APP заболевания,

например, церебральной амилоидной ангиопатии (CAA) или болезни Альцгеймера (AD), например, семейной болезни Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

Соответственно в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено средство (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и где антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30. В определенных вариантах осуществления отличия типа замены тимин на урацил и/или урацил на тимин между выровненными (сравниваемыми) последовательностями не считаются нуклеотидами, которые отличаются между выровненными (сравниваемыми) последовательностями.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из последовательностей смысловой нити, представленных в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30; и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити, представленных в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна из смысловой нити и антисмысловой нити двухнитевого средства для RNAi содержит один или более липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или более внутренними нуклеотидными положениями необязательно посредством линкера или носителя.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных

нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, где замена на урацил любого тимина из SEQ ID NO: 1-14 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое вносит вклад в отличие, составляющее не более 3 нуклеотидов от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14; и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28, где замена на урацил любого тимина из SEQ ID NO: 15-28 (при сравнении выровненных последовательностей) не считается отличием, которое вносит вклад в отличие, составляющее не более 3 нуклеотидов от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28, где по меньшей мере одна из смысловой нити и антисмысловой нити содержит один или более липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или более внутренними нуклеотидными положениями необязательно посредством линкера или носителя.

В одном варианте осуществления смысловая нить двухнитевого средства для RNAi содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности, представляющей собой нуклеотидную последовательность смысловой нити дуплекса AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738,

AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 или AD-961586.

В другом варианте осуществления антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от антисмысловой нуклеотидной последовательности дуплекса AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-

392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738, AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 или AD-961586.

Необязательно двухнитевое средство для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В определенных вариантах осуществления липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью $\log K_{ow}$, превышает 0.

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность двухнитевого средства для RNAi, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови для двухнитевого средства для RNAi, превышает 0,2. В родственном варианте осуществления анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с применением белка, представляющего собой сывороточный альбумин человека.

В определенных вариантах осуществления все из нуклеотидов смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления практически все из нуклеотидов антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. Необязательно все из нуклеотидов смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В определенных вариантах осуществления все из нуклеотидов антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. Необязательно все из нуклеотидов смысловой нити и все из нуклеотидов антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов представляет собой дезоксинуклеотид, 3′-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2′-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, 2′-дезокси-модифицированный нуклеотид, запертый нуклеотид, незапертый нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, конформационно затрудненный этилом нуклеотид, нуклеотид с удаленным азотистым основанием, 2′-амино-модифицированный нуклеотид, 2′-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2′-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2′-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2′-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2′-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолиновый нуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий не встречающееся в природе основание, тетрагидропиран-модифицированный нуклеотид, 1,5-ангидрогекситол-модифицированный нуклеотид, циклогексенил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5′-фосфотиоатную группу, нуклеотид, содержащий 5′-метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5′-фосфат или имитатор 5′-фосфата, нуклеотид, содержащий винилфосфат, нуклеотид, содержащий аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотид, содержащий S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотид, содержащий 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотид, содержащий 2′-дезокситимидин-3′-фосфат, нуклеотид, содержащий 2′-дезоксигуанозин-3′-фосфат, или концевой нуклеотид, связанный с холестериловым производным и/или бисдециламидной группой додекановой кислоты.

В родственном варианте осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой 2′-дезокси-2′-фтор-модифицированный нуклеотид, 2′-дезоксимодифицированный нуклеотид, 3′-концевые дезокситиминовые нуклеотиды (dT), запертый нуклеотид,

нуклеотид с удаленным азотистым основанием, 2′-амино-модифицированный нуклеотид, 2′-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолиновый нуклеотид, фосфорамидат и/или нуклеотид, содержащий не встречающееся в природе основание.

В одном варианте осуществления модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3′-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

В другом варианте осуществления модификации нуклеотидов представляют собой 2′-O-метил-, 2′-фтор- и GNA-модификации.

В дополнительном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь. Необязательно двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

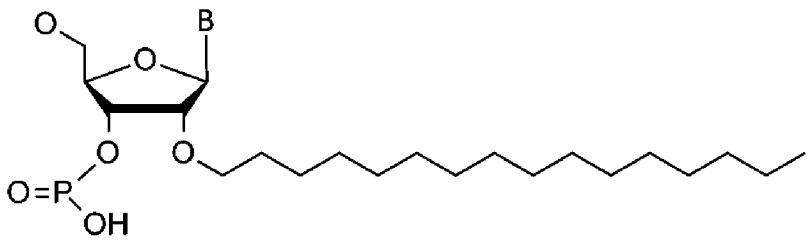
В определенных вариантах осуществления длина участка комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов. Необязательно длина участка комплементарности составляет 19-23 нуклеотида. Необязательно длина участка комплементарности составляет 19 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления длина каждой нити составляет не более 30 нуклеотидов.

В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида. Необязательно по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит C16-лиганд, конъюгированный с 3′-концом, 5′-концом или 3м-концом и 5′-концом смысловой нити посредством одновалентного или разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



,

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

В другом варианте осуществления участок комплементарности содержит любую из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

В дополнительном варианте осуществления участок комплементарности представляет собой участок любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

В некоторых вариантах осуществления внутренние нуклеотидные положения включают все положения, за исключением двух концевых положений на каждом конце нити.

В родственном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений на каждом конце нити. Необязательно внутренние положения исключают участок сайта расщепления смысловой нити.

В одном варианте осуществления внутренние положения исключают положения 9-12, считая от 5′-конца смысловой нити.

В другом варианте осуществления внутренние положения исключают положения 11-13, считая от 3′-конца смысловой нити. Необязательно внутренние положения исключают участок сайта расщепления антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления внутренние положения исключают положения 12-14, считая от 5′-конца антисмысловой нити.

В другом варианте осуществления внутренние положения исключают положения 11-13 смысловой нити, считая от 3′-конца, и положения 12-14 антисмысловой нити, считая от 5′-конца.

В дополнительном варианте осуществления один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более из следующих внутренних положений: положениями 4-8 и 13-18 смысловой нити и положениями 6-10 и 15-18 антисмысловой нити, считая от 5′-конца каждой нити. Необязательно один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более из следующих внутренних положений: положениями 5, 6, 7, 15 и 17 смысловой нити и положениями 15 и 17 антисмысловой нити, считая от 5′-конца каждой нити.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение. Необязательно липофильный фрагмент представляет собой липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-O-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексианол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_4-C_{30}углеводородную цепь и необязательную выбранную функциональную группу, которая представляет собой гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_6-C_{18}углеводородную цепь. Необязательно липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_{16}углеводородную цепь. В родственном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который замещает один или более нуклеотидов во внутреннем(-их) положении(-ях). В определенных вариантах осуществления носитель представляет собой циклическую группу, которая представляет собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил, [1,3]диоксоланил, оксазолидинил,

изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на сериноловом остове или диэтаноламиновом остове.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с двухнитевым средством для RNAi посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевину, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

В другом варианте осуществления основе двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит фосфат или имитатор фосфата на 5′-конце антисмысловой нити. Необязательно имитатор фосфата представляет собой 5′-винилфосфонат (VP).

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на рецептор, который опосредует доставку в ткань ЦНС. В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд представляет собой C16-лиганд.

В некоторых вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань головного мозга.

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгированы посредством биорасщепляемого линкера, который представляет собой ДНК, РНК, дисульфид, амид, функционализированные моносахариды или олигосахариды из галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и/или их комбинацию.

В родственном варианте осуществления 3′-конец смысловой нити защищен концевой кэппирующей группой, которая представляет собой циклическую группу, содержащую амин, при этом циклическая группа представляет собой пирролидинил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолинил, имидазолидинил, пиперидинил, пиперазинил,

[1,3]диоксоланил, оксазолидинил, изоксазолидинил, морфолинил, тиазолидинил, изотиазолидинил, хиноксалинил, пиридазинонил, тетрагидрофуранил или декалинил.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, который представляет собой 2′-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, который содержит гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) и/или нуклеотид, который содержит винилфосфат. Необязательно средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой из следующих модификаций: 2′-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), и нуклеотид, содержащий винилфосфат.

В другом варианте осуществления средство для RNAi содержит паттерн модифицированных нуклеотидов, показанный на фиг. 1A, фиг. 1B, в таблице 2A, таблице 5A или таблица 9 (где местоположение 2′-C16-, 2′-O-метил-, GNA-, фосфотиоатных и 2′-фтор-модификаций является таким, как показано на фиг. 1A, фиг. 1B, в таблице 2A, таблице 5A или таблице 9, независимо от индивидуальных последовательностей нуклеотидных оснований показанных средств для RNAi).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (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 N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

В одном варианте осуществления i составляет 0; j составляет 0; i составляет 1; j составляет 1; оба i и j составляют 0, или оба i и j составляют 1.

В другом варианте осуществления k составляет 0; l составляет 0; k составляет 1; l составляет 1; оба k и l составляют 0; или оба k и l составляют 1.

В определенных вариантах осуществления XXX является комплементарным X′X′X′, YYY является комплементарным Y′Y′Y′, а ZZZ является комплементарным Z′Z′Z′.

В другом варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

В дополнительном варианте осуществления мотив Y′Y′Y′ находится в положениях 11, 12 и 13 от 5′-конца антисмысловой нити. Необязательно Y′ представляет собой 2′-O-метил.

В некоторых вариантах осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a -Y Y Y -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y′Y′Y′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIa).

В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y′Y′Y′-$N_{b'}$-Z′Z′Z′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIb),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В дополнительном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a –X X X -N_b -Y Y Y -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- X′X′X′-$N_{b'}$- Y′Y′Y′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIc),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления формула (III) представлена формулой (IIId):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a –X X X- N_b -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- X′X′X′- $N_{b'}$-Y′Y′Y′-$N_{b'}$-Z′Z′Z′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIId),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, а каждый N_a и N_a′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В другом варианте осуществления длина двухнитевого участка составляет 15-30 пар нуклеотидов. Необязательно длина двухнитевого участка составляет 17-23 пары нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления длина двухнитевого участка составляет 17-25 пар нуклеотидов. Необязательно длина двухнитевого участка составляет 23-27 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина двухнитевого участка составляет 19-21 пару нуклеотидов. Необязательно длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов. Необязательно каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

В другом варианте осуществления модификации нуклеотидов в средстве для RNAi представляют собой LNA, гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), HNA, CeNA, 2′-метоксиэтил, 2′-O-алкил, 2′-O-аллил, 2′-C-аллил, 2′-фтор, 2′-дезокси и/или 2′-гидроксил и их комбинации. Необязательно модификации нуклеотидов включают 2′-O-метил, 2′-фтор и/или GNA и их комбинации. В родственном варианте осуществления модификации нуклеотидов представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит лиганд, который представляет собой или содержит один или более C16-фрагментов, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В определенных вариантах осуществления лиганд присоединен к 3′-концу смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В родственном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3′-конце одной нити. Необязательно нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить. В родственном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5′-конце одной нити. Необязательно нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В другом варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5′-, так и на 3′-конце одной нити. Необязательно нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В дополнительном варианте осуществления пара оснований в положении 1 от 5′-конца антисмысловой нити дуплекса средства для RNAi представляет собой пару оснований A:U.

В определенных вариантах осуществления нуклеотиды Y содержат 2′-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды Y′ содержат 2′-O-метил-модификацию.

В определенных вариантах осуществления p′>0. Необязательно p′=2.

В некоторых вариантах осуществления q′=0, p=0, q=0, а нуклеотиды выступающего конца p′ комплементарны целевой мРНК.

В определенных вариантах осуществления q′=0, p=0, q=0, а нуклеотиды выступающего конца p′ не комплементарны целевой мРНК.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

В другом варианте осуществления по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. Необязательно все n_p' связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

В определенных вариантах осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой одно из средств, перечисленных в таблице 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6 и/или 9.

В некоторых вариантах осуществления все из нуклеотидов смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити содержат модификацию.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (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 N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III),

где:

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил-модификацию, модификации на основе гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) или 2′-фтор-модификацию;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\,3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\,5'$ (III),

где:

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III),

где:

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}Y\ Y\ Y\ \text{-}\ N_a\ \text{-}\ n_q\ 3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}\ Y'Y'Y'\text{-}\ N_a'\text{-}\ n_q'\ 5'$ (IIIa),

где:

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый из YYY и Y'Y'Y' независимо представляет один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации.

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28, где практически все из нуклеотидов смысловой нити содержат модификацию, которая представляет собой 2'-O-метил-модификацию, GNA- и/или 2'-фтор-модификацию, где смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все из нуклеотидов антисмысловой нити содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая нить конъюгирована с одним или более C16-лигандами.

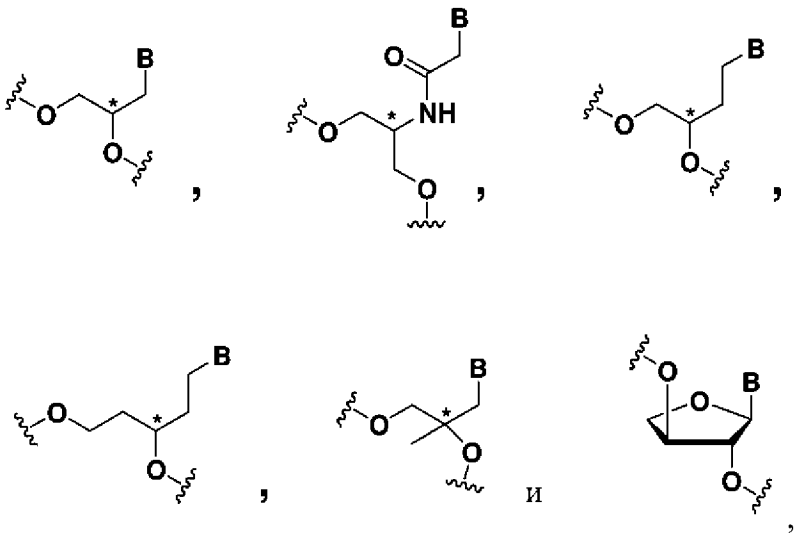
В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15

смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, и антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28, где смысловая нить содержит по меньшей мере один 3′-концевой дезокситиминовый нуклеотид (dT), и где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один 3′-концевой дезокситиминовый нуклеотид (dT).

В одном варианте осуществления все из нуклеотидов смысловой нити и все из нуклеотидов антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

В другом варианте осуществления каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5′-участка или его предшественника. Необязательно нарушающая термостабильность дуплекса модификация представляет собой одну или более из



где B представляет собой нуклеиновое основание.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена клетка, содержащая двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена APP, которая содержит двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в незабуференном растворе. Необязательно незабуференный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

В другом варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят с буферным раствором. Необязательно буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В другом варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, которая содержит двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению и липидный состав.

В одном варианте осуществления липидный состав содержит LNP.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, включающий: (a) приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi по настоящему изобретению или фармацевтической композицией по настоящему изобретению; и (b) поддержание жизнедеятельности клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для осуществления разрушения мРНК-транскрипта гена APP, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена APP в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в организме субъекта. Необязательно субъектом является человек.

В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой макака-резуса, яванского макака, мышь или крысу.

В одном варианте осуществления субъект-человек страдает от ассоциированного с APP нарушения. Необязательно ассоциированное с APP заболевание представляет собой церебральную амилоидную ангиопатию (CAA).

В другом варианте осуществления ассоциированное с APP нарушение представляет собой семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD). В дополнительном варианте осуществления ассоциированное с APP нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера (AD).

В определенных вариантах осуществления экспрессия APP ингибируется под действием средства для RNAi на по меньшей мере приблизительно 30%.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения субъекта, страдающего от нарушения, при котором снижение экспрессии APP будет оказывать благоприятное воздействие, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение субъекта.

В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В определенных вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту интратекально.

В определенных вариантах осуществления введение субъекту двухнитевого средства для RNAi обеспечивает уменьшение накопления Aβ. Необязательно введение субъекту двухнитевого средства для RNAi обеспечивает уменьшение накопления Aβ(1-40) и/или Aβ(1-42).

В родственных вариантах осуществления введение субъекту dsRNA обеспечивает уменьшение образования и/или накопления амилоидных бляшек у субъекта.

В одном варианте осуществления способ приводит к снижению экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга. Необязательно ткань головного мозга или спинного мозга находится в коре, мозжечке, полосатом теле, шейном отделе позвоночника, поясничном отделе позвоночника и/или грудном отделе позвоночника.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ ингибирования экспрессии APP у субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется подавление экспрессии APP у субъекта.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения или предупреждения ассоциированного с APP заболевания или нарушения у субъекта, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение или предупреждение ассоциированного с APP заболевания или нарушения у субъекта.

В определенных вариантах осуществления ассоциированное с APP заболевание или нарушение представляет собой церебральную амилоидную ангиопатию (CAA) и/или болезнь Альцгеймера (AD). Необязательно AD представляет собой семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для осуществления способа по настоящему изобретению, при этом набор содержит: a) двухнитевое средство для RNAi по настоящему изобретению, b) инструкции по применению, и c) необязательно средство для введения двухнитевого средства для RNAi субъекту.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрено средство (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и где антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из последовательностей нуклеиновых оснований антисмысловой нити из AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-

392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738, AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 или AD-961586.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит одну или более из следующих модификаций: 2′-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, 2′-C-алкил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоат (PS) и винилфосфонат (VP). Необязательно средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой из следующих модификаций: 2′-O-метил-модифицированный

нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, 2′-С-алкил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоат и винилфосфонат (VP).

В другом варианте осуществления средство для RNAi содержит четыре или более PS-модификаций, необязательно от шести до десяти PS-модификаций, необязательно восемь PS-модификаций.

В дополнительном варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi имеет 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит восемь PS-модификаций, расположенных при каждой из предпоследней и последней межнуклеотидных связей от соответствующих 3′- и 5′-концов каждой из смысловой и антисмысловой нитей средства для RNAi.

В другом варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит только один нуклеотид, содержащий GNA. Необязательно нуклеотид, содержащий GNA, расположен на антисмысловой нити при седьмом остатке нуклеинового основания от 5′-конца антисмысловой нити.

В дополнительном варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит от одного до четырех 2′-С-алкил-модифицированных нуклеотида. Необязательно 2′-С-алкил-модифицированный нуклеотид представляет собой 2′-С16-модифицированный нуклеотид. Необязательно средство для RNAi содержит один 2′-С16-модифицированный нуклеотид. Необязательно один 2′-С16-модифицированный нуклеотид расположен на смысловой нити в положении шестого нуклеинового основания от 5′-конца смысловой нити или в положении концевого нуклеинового основания 5′-конца.

В другом варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi имеет 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. Необязательно каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. Необязательно 2′-фтор-модифицированные

нуклеотиды расположены на смысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 2, 14 и 16 от 5′-конца антисмысловой нити.

В дополнительном варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi имеет 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит одну или более VP-модификаций. Необязательно средство для RNAi содержит одну VP-модификацию на 5′-конце антисмысловой нити.

В другом варианте осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и средство для RNAi содержит два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида. Необязательно средство для RNAi содержит 2′-O-метил-модифицированные нуклеотиды во всех положениях нуклеиновых оснований, не модифицированных 2′-фтором, 2′-C-алкилом или гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA). Необязательно два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида расположены на смысловой нити в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 от 5′-конца антисмысловой нити.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено средство (для RNAi) на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и где антисмысловая нить содержит участок длиной по меньшей мере 15 смежных нуклеиновых оснований, который является в достаточной степени комплементарным целевой последовательности APP, представляющей собой APP NM_00484 в положениях 1891-1919; APP NM_00484 положениях 2282-2306; APP NM_00484 в положениях 2464-2494; APP NM_00484 в положениях 2475-2638; APP NM_00484 в положениях 2621-2689; APP NM_00484 в положениях 2682-2725; APP NM_00484 в положениях 2705-2746; APP NM_00484 в положениях 2726-2771; APP NM_00484 в положениях 2754-2788; APP NM_00484 в положениях 2782-2813; APP NM_00484 в положениях 2801-2826; APP NM_00484 в положениях 2847-2890; APP NM_00484 в положениях 2871-2896; APP NM_00484 в положениях 2882-2960; APP NM_00484 в положениях 2942-2971; APP NM_00484 в положениях 2951-3057; APP

NM_00484 в положениях 3172-3223; APP NM_00484 в положениях 3209-3235; NM_00484 в положениях 3256-3289; APP NM_00484 в положениях 3302-3338; APP NM_00484 в положениях 3318-3353; APP NM_00484 в положениях 3334-3361, APP NM_001198823.1 в положениях 251-284; APP NM_001198823.1 в положениях 362-404; APP NM_001198823.1 в положениях 471-510; APP NM_001198823.1 в положениях 532-587; APP NM_001198823.1 в положениях 601-649; APP NM_001198823.1 в положениях 633-662; APP NM_001198823.1 в положениях 1351-1388; APP NM_001198823.1 в положениях 1609-1649; APP NM_001198823.1 в положениях 1675-1698; APP NM_001198823.1 в положениях 1752-1787; APP NM_001198823.1 в положениях 2165-2217; APP NM_001198823.1 в положениях 2280-2344 или APP NM_001198823.1 в положениях 2403-2431, для осуществления нокдауна APP, и который отличается не более 3 нуклеотидами на протяжении по меньшей мере 15 смежных нуклеиновых оснований, в достаточной степени комплементарных целевой последовательности APP для осуществления нокдауна APP.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено двухнитевое средство для RNAi, которое содержит одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата (PS) и винилфосфоната (VP), необязательно где указанное средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой модификации, выбранной из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата и винилфосфоната (VP).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что средство для RNAi содержит четыре или более PS-модификаций, необязательно от шести до десяти PS-модификаций, необязательно восемь PS-модификаций.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит восемь PS-модификаций, расположенных при предпоследней и последней межнуклеотидных связях от соответствующих 3′- и 5′-концов каждой из смысловой и антисмысловой нитей средства для RNAi.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит только один нуклеотид, содержащий GNA, необязательно где нуклеотид, содержащий GNA, расположен на антисмысловой нити в седьмом остатке нуклеинового основания от 5′-конца антисмысловой нити.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит от одного до четырех 2′-C-алкил-модифицированных нуклеотида, необязательно где 2′-C-алкил-модифицированный нуклеотид представляет собой 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно где средство для RNAi содержит один 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно один 2′-C16-модифицированный нуклеотид расположен на смысловой нити в положении шестого нуклеинового основания от 5′-конца смысловой нити или в положении концевого нуклеинового основания 5′-конца.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида, необязательно где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида, необязательно где 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды расположены на смысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 2, 14 и 16 от 5′-конца антисмысловой нити.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит одну или более VP-модификаций, необязательно где средство для RNAi содержит одну VP-модификацию на 5′-конце антисмысловой нити.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено, что каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида, необязательно где средство для RNAi содержит 2′-O-метил-модифицированные

нуклеотиды во всех положениях нуклеиновых оснований, не модифицированных 2′-фтором, 2′-C-алкилом или гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), необязательно где два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида расположены на смысловой нити в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 от 5′-конца антисмысловой нити.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Следующее подробное описание, приведенное в качестве примера, но не предназначенное для ограничения настоящего изобретения исключительно специфическими описанными вариантами осуществления, может быть наилучшим образом понято в сочетании с прилагаемыми графическими материалами, на которых изображено следующее.

На фиг. 1A и фиг. 1B показано схематическое изображение модифицированных средств для RNAi, тестируемых в отношении активности осуществления нокдауна hsAPP in vivo.

На фиг. 2A и фиг. 2B показаны результаты анализа активности осуществления нокдауна hsAPP in vivo, наблюдаемые для модифицированных средств для RNAi, показанных на фиг. 1A и фиг. 1B.

На фиг. 3A представлена схема, демонстрирующая стратегию для идентификации высокоактивных siRNA для APP человека (hAPP) в рамках целенаправленного воздействия на наследственную церебральную амилоидную ангиопатию (hCAA).

На фиг. 3B представлена диаграмма процента оставшейся мРНК в эндогенном in vitro скрининге siRNA для hAPP при концентрации 10 нМ в клетках Be(2)C.

На фиг. 4A представлена схема, демонстрирующая временные рамки трансфекции siRNA для APP в нейроны BE(2)C. siRNA для APP трансфицировали из расчета 10, 1 и 0,1 нМ и оценивали через 24 и 48 часов после трансфекции.

На фиг. 4B представлен график, показывающий применяемую концентрацию siRNA-дуплекса для APP в сопоставлении с процентом оставшейся мРНК в клетках BE(2)C через 48 часов после трансфекции.

На фиг. 4C представлены два графика растворимых разновидностей APP, альфа (вверху) и бета (внизу), в супернатанте клеток BE(2)C через 48 часов после трансфекции.

На фиг. 5A представлена схема, демонстрирующая дизайн скринингового исследования siRNA для APP у отличных от человека приматов (NHP). Оценивали 5 соединений, и для каждого эксперимента использовали по 5 животных. Однократную интратекальную (IT) инъекцию в дозе 72 мг представляющего интерес соединения вводили в начале исследования.

На фиг. 5B представлены два графика растворимых разновидностей APP, альфа (вверху) и бета (внизу), в BE(2)C (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454972, нацеливающегося на APP.

На фиг. 5C представлен график, показывающий результаты нокдауна мРНК в ткани в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454972, нацеливающегося на APP.

На фиг. 5 D представлена схема, демонстрирующая структуру соединения AD-454972, нацеливающегося на APP (вверху), и таблица, показывающая уровни доставки соединения AD-454972 в ткань в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454972, нацеливающегося на APP (внизу).

На фиг. 6 представлены два графика, показывающие результаты анализа содержания растворимых APP, альфа и бета (вверху), в CSF и разновидностей бета-амилоида в CSF (внизу), собранной через 2-3 месяца после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454972, нацеливающегося на APP.

На фиг. 7A представлены два графика, показывающие результаты для CSF, собранной в дни 8, 15 и 29 и проанализированной в отношении растворимых APP альфа и бета (вверху) и бета-амилоида 38, 40 и 42 (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454842, нацеливающегося на APP.

На фиг. 7B представлена таблица, показывающая уровни доставки соединения AD-454842 в ткань в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454842, нацеливающегося на APP.

На фиг. 8A представлены два графика, показывающие результаты для CSF, собранной в дни 8, 15 и 29 и проанализированной в отношении растворимых APP альфа и бета (вверху) и бета-амилоида 38, 40 и 42 (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 8B представлен график, показывающий результаты нокдауна мРНК в ткани в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 8C представлена таблица, показывающая уровни доставки соединения AD-454843 в ткань в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 9A представлен два графика, показывающие результаты анализа содержания растворимых APP, альфа и бета (вверху), в CSF и разновидностей бета-амилоида в CSF (внизу), собранной через 2-3 месяца после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 9B представлен график, показывающий результаты нокдауна мРНК в ткани в день 85 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 10A представлены два графика, показывающие результаты для CSF, собранной в дни 8, 15 и 29 и проанализированной в отношении растворимых APP альфа и бета (вверху) и бета-амилоида 38, 40 и 42 (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454844, нацеливающегося на APP.

На фиг. 10B представлен график, показывающий результаты нокдауна мРНК в ткани в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454844, нацеливающегося на APP.

На фиг. 10C представлена схема, демонстрирующая структуру соединения AD-454844, нацеливающегося на APP (вверху), и таблица, показывающая уровни доставки соединения AD-454844 в ткань в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг AD-454844, нацеливающегося на APP (внизу).

На фиг. 11A представлена таблица, показывающая высокий уровень доставки соединения в ткань в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг siRNA, нацеливающейся на APP.

На фиг. 11B представлен график, показывающий результаты нокдауна мРНК в ткани в день 29 после IT введения яванским макакам при высоком уровне (фиг. 11A) доставки соединения, нацеливающегося на APP.

На фиг. 11C представлены два графика, показывающие результаты для CSF, собранной в дни 8, 15 и 29 и проанализированной в отношении растворимых APP альфа и бета (вверху) и бета-амилоида 38, 40 и 42 (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг при высоком уровне доставки соединения (фиг. 11A), нацеливающегося на APP.

На фиг. 12A представлены две диаграммы, показывающие среднее значение для исследований 5 miRNA-дуплексов. На верхней панели представлена диаграмма размаха для результатов 5 соединений в день 29 после IT введения яванским макакам 72 мг siRNA. На нижней панели представлена диаграмма размаха для количества мРНК, оставшейся в каждой ткани относительно контроля через 29 дней после IT введения яванским макакам.

На фиг. 12B представлены два графика, показывающие повторные исследования miRNA-дуплекса, в которых CSF собирали в дни 8, 15 и 29 и анализировали в отношении растворимых APP альфа и бета (вверху) и бета-амилоида 38, 40 и 42 (внизу) после IT введения яванским макакам 72 мг соединений siRNA, нацеливающихся на APP.

На фиг. 13A представлен график, демонстрирующий процент мРНК APP, оставшейся в ткани полосатого тела через 29 дней после IT введения яванским макакам AD-454972, нацеливающегося на APP.

На фиг. 13B представлен график, демонстрирующий процент мРНК APP, оставшейся в ткани полосатого тела через 29 дней после IT введения яванским макакам AD-454973, нацеливающегося на APP.

На фиг. 13C представлен график, демонстрирующий процент мРНК APP, оставшейся в ткани полосатого тела через 29 дней после IT введения яванским макакам AD-454842, нацеливающегося на APP.

На фиг. 13D представлен график, демонстрирующий процент мРНК APP, оставшейся в ткани полосатого тела через 29 дней после IT введения яванским макакам AD-454843, нацеливающегося на APP.

На фиг. 13E представлен график, демонстрирующий процент мРНК APP, оставшейся в ткани полосатого тела через 29 дней после IT введения яванским макакам AD-454844, нацеливающегося на APP.

На фиг. 14A и фиг. 14B представлены схематические изображения модифицированных средств для RNAi, содержащих затравочные области с высоким содержанием AU, которые подвергали скринингу в отношении активности осуществления нокдауна hsAPP *in vivo* у мышей.

На фиг. 15 представлен график, изображающий % нокдауна hsAPP в печени мышей AAV8.HsAPP-CDS3TRNC, обработанных затравочными областями с высоким содержанием AU. В график включены PBS-контроль, контроль без воздействия и контроли с AD-392927 (RLD592).

На фиг. 16A-16D представлены схематические изображения модифицированных лидерных средств для RNAi, которые подвергали скринингу в отношении активности осуществления нокдауна hsAPP *in vivo* у мышей с введенным AAV.

На фиг. 17A и фиг. 17B представлены графики, изображающие % нокдауна hsAPP в печени мышей AAV8.HsAPP-CDS3TRNC, обработанных лидерными олигонуклеотидами. В график включены PBS-контроль и контроль без воздействия.

На фиг. 18A-18D представлены схематические изображения модифицированных лидерных средств для RNAi, которые подвергали скринингу в отношении активности осуществления нокдауна hsAPP *in vivo* у мышей с введенным AAV и которые группировали в семейства на основе исходного соединения AD-886864 (фиг. 18A), исходного соединения AD-886899 (фиг. 18B), исходного соединения AD-886919 (фиг. 18 C) и исходного соединения AD-886823 (фиг. 18D) соответственно.

На фиг. 19 представлена схема, демонстрирующая дизайн скринингового исследования нокдауна APP у отличных от человека приматов (NHP) в рамках 4-месячного исследования AD-454844, в котором яванским макакам в начале исследования вводили

однократную интратекальную (IT) инъекцию, содержащую 60 мг представляющего интерес соединения.

На фиг. 20A-20G представлены данные скринингов *in vivo* 6 конъюгатов siRNA и C16, включая исходное соединение AD-454855 и 5 дополнительных конъюгатов siRNA, полученных в ходе исследований взаимосвязи структуры и активности AD-454855. На графиках изображен процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после интратекального введения 60 мг каждого соединения. На фиг. 20A представлен график содержания растворимых APP альфа и бета через 4 месяца после введения дозы AD-454844 для двух отличных от человека приматов-субъектов. На фиг. 20B представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы AD-454844. На фиг. 20C представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы конъюгата siRNA и 5′-концевого C16, AD-994379. На фиг. 20D представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы AD-961583. На фиг. 20E представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы AD-961584. На фиг. 20F представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы AD-961585. На фиг. 20G представлен график, изображающий процент растворимых APP альфа и бета, собранных из CSF в дни 8, 15 и 19 после введения дозы AD-961586.

На фиг. 21A и 21B представлены схематические изображения C16-модифицированных лидерных средств для RNAi, которые подвергали скринингу в отношении активности осуществления нокдауна APP *in vivo* у отличных от человека приматов. На фиг. 21A представлена схема исходного средства для RNAi с внутренним C16, AD-454844, и средства на основе siRNA с 5′-концевым C16, AD-994379. На фиг. 21B представлена схема средств для RNAi, AD-961583, AD-961584, AD-961585 и AD-961586.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрены композиции для RNAi, которые вызывают опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена белка-предшественника амилоида (APP). Ген APP может

находиться внутри клетки, например, внутри клетки субъекта, такого как человек. В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения композиций для RNAi по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена APP и/или для лечения субъекта, имеющего нарушение, при котором подавление или снижение экспрессии гена APP будет оказывать благоприятное воздействие, например, ассоциированное с APP заболевание, например, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA) или болезнь Альцгеймера (AD), например, семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

Средства для RNAi по настоящему изобретению включают нить РНК (антисмысловую нить), имеющую участок, длина которого составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше, например, длина составляет 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида, при этом участок является практически полностью комплементарным по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена APP.

В определенных вариантах осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению могут содержать нить РНК (антисмысловую нить) с большей длиной, например, длиной до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида, при этом она содержит участок из по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, который практически полностью комплементарен по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена APP. Эти средства для RNAi с антисмысловыми нитями большей длины предпочтительно содержат вторую нить РНК (смысловую нить) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая нити образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение этих средств для RNAi обеспечивает возможность целенаправленного разрушения мРНК гена APP у млекопитающих. Очень низкие дозировки средств для RNAi, нацеливающихся на APP, могут, в частности, специфично и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (RNAi), что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена APP. С помощью клеточных анализов авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что средства для RNAi,

нацеливающиеся на APP, могут опосредовать RNAi, что приводит к значительному ингибированию экспрессии гена APP. Таким образом, способы и композиции, содержащие средства для RNAi, применимы для лечения субъекта, на которого снижение уровней и/или активности белка APP будет оказывать благоприятное воздействие, такого как субъект, имеющий ассоциированное с APP заболевание, например CAA или AD, включая, например, EOFAD.

В следующем подробном описании раскрыт порядок получения и применения композиций, содержащих средства для RNAi, для ингибирования экспрессии гена APP, а также композиций и способов лечения субъектов, имеющих заболевания и нарушения, на которые подавление и/или снижение экспрессии данного гена будет оказывать благоприятное воздействие.

I. Определения

Для более легкого понимания настоящего изобретения вначале приведены 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.

Формы единственного числа применяются в данном документе для обозначения одного или более одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. В качестве примера «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, совокупность 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» и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

Термин «приблизительно» используется 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 чисел или диапазоном, понятно, что «приблизительно» может модифицировать каждое из чисел в группе или диапазоне.

Термин «по меньшей мере» перед числом или группой чисел понимают как включающий число, находящееся рядом с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые могут быть по логике включены, что ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно представлять собой целое число. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов из молекулы нуклеиновой кислоты длиной 21 нуклеотид» означает, что указанным свойством обладают 18, 19, 20 или 21 нуклеотид. В случае, когда «по меньшей мере» находится перед группой чисел или диапазоном, понятно, что «по меньшей мере» может модифицировать каждое из чисел в группе или диапазоне.

Используемые в данном документе фразы «не более чем» или «менее чем» понимают как значение, примыкающее к фразе, 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 чисел или диапазоном, понятно, что «не более чем» может модифицировать каждое из чисел в группе или диапазоне.

Термин «APP», белок-предшественник амилоида (APP), также известный, среди других названий, как белок-предшественник бета-амилоида, амилоидный белок при болезни Альцгеймера и амилоидный пептид сосудов головного мозга, относится к белку, имеющему аминокислотную последовательность из любого источника, относящегося к позвоночным или млекопитающим, в том числе без ограничения человека, крупного рогатого скота, курицы, грызуна, мыши, крысы, свиньи, овцы, примата, обезьяны и морской свинки, если не указано иное. Термин также относится к фрагментам и вариантам нативного APP, которые сохраняют по меньшей мере одну активность нативного APP *in vivo* или *in vitro* (включая среди прочего, например, формы пептида Aβ, представляющие собой бета-амилоидный пептид (1-40), бета-амилоидный пептид (1-38) и бета-амилоидный пептид (1-42)), включая варианты фрагментов APP, которые сохраняют одну или более активностей фрагмента APP, которые являются нейротоксичными по своему характеру (например, явным образом предусмотрены

формы вариантов пептида Aβ42, которые сохраняют нейротоксический характер). Термин охватывает полноразмерные непроцессированные формы-предшественники APP, а также зрелые формы, образуемые за счет посттрансляционного отщепления сигнального пептида. Термин также охватывает пептиды, которые образуются из APP путем дальнейшего расщепления, включая, например, пептиды Aβ. Нуклеотидную и аминокислотную последовательность APP человека можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 228008405 (NM_201414; SEQ ID NO: 1). Нуклеотидную и аминокислотную последовательность APP человека также можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 228008403 (NM_000484.3; SEQ ID NO: 2); под № доступа в GenBank GI: 228008404 (NM_201413.2; SEQ ID NO: 3); под № доступа в GenBank GI: 324021746 (NM_001136016.3; SEQ ID NO: 4); под № доступа в GenBank GI: 228008402 (NM_001136129.2; SEQ ID NO: 5); под № доступа в GenBank GI: 228008401 (NM_001136130.2; SEQ ID NO: 6); под № доступа в GenBank GI: 324021747 (NM_001136131.2; SEQ ID NO: 7); под № доступа в GenBank GI: 324021737 (NM_001204301.1; SEQ ID NO: 8); под № доступа в GenBank GI: 324021735 (NM_001204302.1; SEQ ID NO: 9), и под № доступа в GenBank GI: 324021739 (NM_001204303.1; SEQ ID NO: 10); и под № доступа в GenBank GI: 1370481385 (XM_024452075.1; SEQ ID NO: 11).

Нуклеотидную и аминокислотную последовательность APP яванского макака можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 982237868 (XM_005548883.2; SEQ ID NO: 12). Нуклеотидную и аминокислотную последовательность APP мыши можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 311893400 (NM_001198823; SEQ ID NO: 13). Нуклеотидную и аминокислотную последовательность APP крысы можно найти, например, под № доступа в GenBank GI: 402692725 (NM_019288.2; SEQ ID NO: 14). Дополнительные примеры последовательностей APP можно легко получить с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt и OMIM.

Используемый в данном документе термин «APP» также относится к конкретному полипептиду, экспрессируемому в клетке за счет гена APP со встречающимися в природе вариантами последовательности ДНК, такими как однонуклеотидный полиморфизм в гене APP. В пределах гена APP были идентифицированы многочисленные SNP, и их можно найти, например, в dbSNP от NCBI (см., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Неограничивающие примеры SNP в пределах гена APP

можно найти, например, в dbSNP от NCBI под №№ доступа rs193922916, rs145564988, rs193922916, rs214484, rs281865161, rs364048, rs466433, rs466448, rs532876832, rs63749810, rs63749964, rs63750064, rs63750066, rs63750151, rs63750264, rs63750363, rs63750399, rs63750445, rs63750579, rs63750643, rs63750671, rs63750734, rs63750847, rs63750851, rs63750868, rs63750921, rs63750973, rs63751039, rs63751122 и rs63751263. Как было описано ранее, определенные иллюстративные редкие варианты APP, которые играют роль в развитии EOFAD, были идентифицированы в Hooli *et al.* (*Neurology* 78: 1250-57). Кроме того, различные «неклассические» варианты APP, которые содержат внутриэкзонное соединение в секвенированной кДНК, недавно были идентифицированы как ассоциированные с возникновением соматической рекомбинации генов в головном мозге пациентов с AD (PCT/US2018/030520, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Примеры таких «неклассических» вариантов APP включают cAPP-R3/16 (SEQ ID NO: 1865), cAPP-R3/16-2 (SEQ ID NO: 1866), cAPP-R2/18 (SEQ ID NO: 1867), cAPP-R6/18 (SEQ ID NO: 1868), cAPP-R3/14 (SEQ ID NO: 1869), cAPP-R3/17 (SEQ ID NO: 1870), cAPP-R1/11 (SEQ ID NO: 1871), cAPP-R1/13 (SEQ ID NO: 1872), cAPP-R1/11-2 (SEQ ID NO: 1873), cAPP-R1/14 (SEQ ID NO: 1874), cAPP-R2/17 (SEQ ID NO: 1875), cAPP-R2/16 (SEQ ID NO: 1876), cAPP-R6/17 (SEQ ID NO: 1877), cAPP-R2/14 (SEQ ID NO: 1878), cAPP-R14/17-d8 (SEQ ID NO: 1879) и cAPP-D2/18-3 (SEQ ID NO: 1880). Явно предполагается, что средства для RNAi по настоящему изобретению могут быть применены для нацеливания на «неклассические» варианты APP и/или что средства для RNAi, необязательно характеризующиеся специфичностью в отношении таких «неклассических» вариантов APP, могут разрабатываться и применяться, необязательно в комбинации с другими средствами для RNAi по настоящему изобретению, включая средства, которые нацеливаются на нативные формы APP. Было описано, что такие «неклассические» варианты APP, в частности, отсутствуют в исследуемой популяции пациентов с HIV, при этом уровень распространения AD в популяции пациентов с HIV значительно снижен по сравнению с ожидаемыми уровнями, что указывает на то, что ингибиторы обратной транскриптазы и/или другие средства антиретровирусной терапии, обычно применяемые для лечения пациентов с HIV, вероятно, также оказывали терапевтическое/профилактическое действие на AD. Следовательно, явно предполагается, что средства для RNAi по настоящему изобретению необязательно можно использовать в комбинации с ингибиторами

обратной транскриптазы и/или другими средствами антиретровирусной терапии для терапевтических и/или профилактических целей.

Используемый в данном документе термин «целевая последовательность» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образуемой в ходе транскрипции гена APP, включая мРНК, которая представляет собой продукт РНК-процессинга первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления длина целевой части последовательности будет по меньшей мере достаточной, чтобы она служила в качестве субстрата для направляемого RNAi расщепления в данной части или рядом с ней нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образующейся в ходе транскрипции гена APP.

Длина целевой последовательности может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов. Например, длина целевой последовательности может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные для 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.

Согласно устоявшейся практике каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» обозначает нуклеотид, который содержит в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно. Однако будет понятно, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или заменяющему фрагменту-имитатору (см., например, таблицу 1). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин 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 dsRNA, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть соответственно заменены гуанином и урацилом с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении.

Термины «iRNA», «средство для RNAi», «средство на основе iRNA», «средство для РНК-интерференции», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК в том значении, в каком это термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). РНК-интерференция (RNAi) представляет собой процесс, который направляет специфическое в отношении последовательности разрушение мРНК. RNAi обеспечивает модулирование, например ингибирование, экспрессии APP в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит однонитевое средство для RNAi, которое взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК APP, чтобы направлять расщепление целевой РНК. Без привязки к какой-либо теории полагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на двухнитевые короткие интерферирующие РНК (siRNA), содержащие смысловую нить и антисмысловую нить, 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 этих dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3′-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Эти siRNA затем встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более хеликаз раскручивают siRNA-

дуплекс, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или более эндонуклеаз в пределах RISC расщепляют мишень с индуцированием сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к однонитевой РНК (ssRNA) (антисмысловой нити siRNA-дуплекса), образующейся внутри клетки, которая содействует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена APP. Соответственно, термин «siRNA» также используется в данном документе для обозначения средства для RNAi, описанного выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может представлять собой однонитевую РНК, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Однонитевые средства для RNAi связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Однонитевые siRNA обычно содержат 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Разработка и тестирование однонитевых РНК 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 siRNA, описанной в данном документе, или в виде последовательности, химически модифицированной с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В другом варианте осуществления «средство для RNAi» для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой двухнитевую РНК, и в данном документе оно называется «двухнитевым средством для RNAi», «молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)», «средством на основе dsRNA» или «dsRNA». Термин «dsRNA» 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» ориентацию по отношению к целевой РНК, т. е. гену APP. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например мРНК, посредством механизма

посттранскрипционного сайленсинга генов, называемого в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большая часть нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или более нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например, дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемый в настоящем описании термин «средство для RNAi» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; при этом средство для RNAi может включать значительные модификации нескольких нуклеотидов. Используемый в данном документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин «модифицированный нуклеотид» охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома в межнуклеозидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа siRNA, охватываются термином «средство для RNAi» в контексте настоящего описания и формулы изобретения.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида, который общепризнанно является встречающейся в природе формой нуклеотида, если он присутствует в пределах средства для RNAi, может рассматриваться как приравнивание к модифицированному нуклеотиду.

Длина дуплексного участка может быть любой, которая обеспечивает возможность специфического разрушения требуемой целевой РНК посредством пути с участием RISC, и может находиться в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, длина составляет приблизительно 15-30 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 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29,

19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные для 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 быть отдельными молекулами 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 «шпилечной петлей». «Шпилечная петля» может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления «шпилечная петля» может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 неспаренных нуклеотида или больше. В некоторых вариантах осуществления «шпилечную петлю» могут составлять 10 нуклеотидов или меньше. В некоторых вариантах осуществления «шпилечную петлю» могут составлять 8 неспаренных нуклеотидов или меньше. В некоторых вариантах осуществления «шпилечную петлю» могут составлять 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления «шпилечную петлю» могут составлять 4-8 нуклеотидов.

Если две практически полностью комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, то эти молекулы не обязательно должны, но могут быть соединены ковалентно. В определенных вариантах осуществления, когда две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывной цепью нуклеотидов между 3′-концом одной нити и 5′-концом соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительная структура называется «линкером» (хотя следует отметить, что некоторые другие структуры, определенные в других разделах в данном документе, также могут называться «линкером»). Нити РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальным числом пар оснований является число нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых выступающих концов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной

структуры средство для RNAi может содержать один или более нуклеотидных выступающих концов. В одном варианте осуществления средства для RNAi по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В других вариантах осуществления по меньшей мере одна нить средства для RNAi содержит 5′-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна нить содержит 5′-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще нескольких других вариантах осуществления как 3′-, так и 5′-конец одной нити средства для RNAi содержит выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению представляет собой dsRNA, каждая нить которой содержит 19-23 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, с целевой последовательностью мРНК APP, для направления расщепления целевой РНК. Без привязки к какой-либо теории полагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, расщепляется на siRNA 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 dsRNA 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 siRNA встраиваются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более хеликаз раскручивают siRNA-дуплекс, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или более эндонуклеаз в пределах RISC расщепляют мишень с индуцированием сайленсинга (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188).

Используемый в данном документе термин «нуклеотидный выступающий конец» относится к по меньшей мере одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры средства для RNAi, например dsRNA. Например, в случае, когда 3′-конец одной нити dsRNA выходит за пределы 5′-конца другой нити или наоборот,

образуется нуклеотидный выступающий конец. dsRNA 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 одной из антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3′-конце и/или 5′-конце. В одном варианте осуществления смысловая нить dsRNA содержит выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3′-конце и/или 5′-конце. В другом варианте осуществления один или более нуклеотидов в выступающем конце заменены на нуклеозидтиофосфат.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить dsRNA содержит выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3′-конце и/или 5′-конце. В одном варианте осуществления смысловая нить dsRNA содержит выступающий конец из 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, на 3′-конце и/или 5′-конце. В другом варианте осуществления один или более нуклеотидов в выступающем конце заменены на нуклеозидтиофосфат.

В определенных вариантах осуществления выступающий конец на смысловой нити или антисмысловой нити или обеих может содержать увеличенные участки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец находится на смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец присутствует на 3′-конце смысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец присутствует на 5′-конце смысловой

нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец находится на антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец присутствует на 3′-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления увеличенный выступающий конец присутствует на 5′-конце антисмысловой нити дуплекса. В определенных вариантах осуществления один или более нуклеотидов выступающего конца заменены на нуклеозидтиофосфат. В определенных вариантах осуществления выступающий конец содержит самокомплементарную часть, так что выступающий конец способен образовывать шпилечную структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

Термины «тупой конец» или «молекула с тупыми концами», используемые в данном документе в отношении dsRNA, означают, что на данном терминальном конце dsRNA отсутствуют неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов, т. е. отсутствует нуклеотидный выступающий конец. Один или оба конца dsRNA могут быть тупыми. Если оба конца dsRNA являются тупыми, то говорится, что dsRNA является «молекулой с тупыми концами». Для внесения ясности, dsRNA «с тупыми концами» представляет собой dsRNA, у которой оба конца являются тупыми, т. е. ни на одном из концов молекулы нет нуклеотидного выступающего конца. Чаще всего такая молекула будет двухнитевой на протяжении всей своей длины.

Термин «антисмысловая нить» или «направляющая нить» относится к нити средства для RNAi, например, dsRNA, которая содержит участок, практически полностью комплементарный целевой последовательности, например, мРНК APP.

Используемый в данном документе термин «участок комплементарности» относится к участку антисмысловой нити, который практически полностью комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности APP, 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, 3 или 2 нуклеотидов от 5′- и/или 3′-конца средства для RNAi.

Используемый в данном документе термин «смысловая нить» или «сопровождающая нить» относится к нити средства для RNAi, которая содержит участок, который практически полностью комплементарен участку антисмысловой нити, в том значении, в котором этот термин определен в данном документе.

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 составляют три основания, которые находятся на одном из концов сайта расщепления и непосредственно прилегают к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления составляют два основания, которые находятся на одном 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 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующей отмывкой (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 техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах средства для RNAi, например, в пределах dsRNA, описанной в данном документе, включают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим 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 полностью комплементарная» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать ошибочное спаривание по одной или более, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 парам 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, ингибированию экспрессии гена посредством пути с участием RISC. Однако, в тех случаях, когда два олигонуклеотида разработаны так, чтобы после гибридизации образовался один или более однонитевых выступающих концов, такие выступающие концы не будут считаться ошибочными спариваниями с точки зрения определения комплементарности. Например, dsRNA, 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.

Как используется 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 dsRNA или между антисмысловой нитью средства для RNAi 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 APP). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК APP, если последовательность практически полностью комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей APP.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, полностью комплементарны целевой последовательности APP. В других вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой нити, раскрытые в данном документе, практически полностью комплементарны целевой последовательности APP и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 1-14 или фрагменту из SEQ ID NO: 1-14, например, комплементарна на приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%.

В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в данном документе, практически полностью комплементарны целевой последовательности APP и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B или 26, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой нити, приведенных в любой из таблиц

2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B или 26, например, комплементарна на приблизительно 85%, на приблизительно 86%, на приблизительно 87%, на приблизительно 88%, на приблизительно 89%, на приблизительно 90%, на приблизительно 91%, на приблизительно 92%, на приблизительно 93%, на приблизительно 94%, на приблизительно 95%, на приблизительно 96%, на приблизительно 97%, на приблизительно 98% или на приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую нить, которая практически полностью комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, является таким же, как и целевая последовательность APP, и где полинуклеотид смысловой нити содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна на протяжении всей своей длины эквивалентному участку нуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 15-28 или фрагменту любой из SEQ ID NO: 15-28, например, комплементарна на приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%.

В одном варианте осуществления по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена APP оценивают по снижению количества мРНК APP, которую можно выделить или выявить в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген APP и которые были обработаны таким образом, что экспрессия гена APP ингибируется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток (контрольными клетками), практически идентичными первой клетке или группе клеток, но которые не были обработаны подобным образом. Степень ингибирования можно выразить в виде

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

Используемая в данном документе фраза «приведение клетки в контакт со средством для RNAi», таким как dsRNA, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vitro* или приведение клетки в

контакт со средством для RNAi *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi может быть приведено в физический контакт с клеткой индивидуумом, осуществляющим способ, или в качестве альтернативы средство для RNAi можно поместить в обстановку, которая обеспечит ему возможность впоследствии прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством для RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем инъекции средства для RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем инъекции средства для RNAi в другую область, например, центральную нервную систему (ЦНС), необязательно посредством интратекальной, интравитреальной или другой инъекции, или в кровоток или подкожное пространство, таким образом, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, средство для RNAi может содержать и/или быть связано с лигандом, например, липофильным фрагментом или фрагментами, описанными ниже и дополнительно подробно описанными, например, в заявках на патент США №№ 62/668072, 62/738747 и/или 62/773082, который направляет и/или иным образом стабилизирует средство для RNAi в представляющем интерес месте, например в ЦНС. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и впоследствии пересаживать субъекту.

В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает «введение» или «доставку средства для RNAi в клетку» путем содействия захвату или поглощению в клетку или их осуществления. Поглощение или захват средства для RNAi может происходить посредством простой диффузии или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных средств или устройств. Введение средства для RNAi в клетку можно осуществлять *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* средство для RNAi можно вводить инъекцией в участок ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает известные из уровня техники способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже в данном документе и/или известны из уровня техники.

Термин «липофил» или «липофильный фрагмент» в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, проявляющему аффинность к липидам. Одним из способов измерения липофильности липофильного фрагмента является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой соотношение концентрации химического вещества в октанольной фазе и его концентрации в водной фазе двухфазной системы при равновесии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой свойство вещества, измеряемое лабораторными методами. Однако его также можно спрогнозировать с применением коэффициентов, свойственных структурным компонентам химического вещества, которые рассчитываются с использованием первопринципных или эмпирических способов (см., например, Tetko et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21 (2001), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Он обеспечивает термодинамический показатель склонности вещества отдавать предпочтение неводной или масляной среде, а не воде (т. е. его гидрофильный/липофильный баланс). Теоретически химическое вещество является липофильным по природе, когда его $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильный фрагмент характеризуется $\log K_{ow}$, превышающим 1, превышающим 1,5, превышающим 2, превышающим 3, превышающим 4, превышающим 5 или превышающим 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ 6-аминогексанола составляет примерно 0,7. С применением того же способа прогнозируется, что $\log K_{ow}$ холестерил-N-(гексан-6-ол)карбамата составляет 10,7.

Липофильность молекулы может изменяться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или аминогруппы к концу липофильного фрагмента может увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильного фрагмента.

В качестве альтернативы гидрофобность двухнитевого средства для RNAi, конъюгированного с одним или более липофильными фрагментами, можно измерять по его характеристикам связывания с белком. Например, в определенных вариантах осуществления несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы крови двухнитевого средства для RNAi может быть определена как положительно коррелирующая с относительной гидрофобностью двухнитевого средства для RNAi,

которая в этом случае может положительно коррелировать с активностью сайленсинга у двухнитевого средства для RNAi.

В одном варианте осуществления осуществляемый анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с применением белка, представляющего собой сывороточный альбумин человека. Иллюстративный протокол этого анализа связывания подробно проиллюстрирован, например, в заявках на патент США №№ 62/668072, 62/738747 и/или 62/773082. Гидрофобность двухнитевого средства для RNAi, измеренная по фракции несвязанной siRNA в анализе связывания, превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 при улучшенной доставке siRNA *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним(-ими) положением(-ями) двухнитевого средства для RNAi обеспечивает оптимальную гидрофобность для улучшенной доставки siRNA *in vivo*.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» означает везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, средство для RNAi или плазмиду, с которой транскрибируется средство для RNAi. 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 примата (такого как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), отличного от примата млекопитающего (такого как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомячок, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся). В варианте осуществления субъектом является человек, такой как человек, подвергаемый лечению или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP; человек, подверженный риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP; человек, имеющий заболевание, нарушение или состояние, на которые

будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP; и/или человек, подвергаемый лечению заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP, как описано в данном документе.

Используемые в данном документе термины «осуществление лечения» или «лечение» обозначают благоприятный или требуемый результат, в том числе без ограничения смягчение или уменьшение интенсивности одного или более симптомов, ассоциированных с экспрессией гена APP и/или продуцированием белка APP, например, ассоциированных с APP заболеваний или нарушений, таких как AD, CAA (например, наследственной CAA) и EOFAD, среди прочего. «Лечение» также может означать увеличение срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни в отсутствие лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня APP у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или больше. В определенных вариантах осуществления снижение составляет по меньшей мере 20%. «Более низкий» в контексте уровня APP у субъекта предпочтительно означает снижение до уровня, принятого как находящийся в пределах диапазона нормы для индивидуума без такого нарушения.

Используемые в данном документе «предупреждение» или «осуществление предупреждения» при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии гена APP или продуцирование белка APP, относятся к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптом экспрессии гена APP, такой как наличие различных форм Aβ (например Aβ38, Aβ40 и / или Aβ42 и т. д.), амилоидных бляшек и/или церебральной амилоидной ангиопатии (CAA) или болезни Альцгеймера (AD), включая, например, семейную болезнь Альцгеймера с ранним

началом (EOFAD). Отсутствие развития заболевания, нарушения или состояния, или ослабление развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, на по меньшей мере приблизительно 10% по принятой в клинической практике шкале для такого заболевания или нарушения), или отсрочка проявления латентных симптомов (например, на несколько дней, недель, месяцев или лет) считаются эффективным предупреждением.

Используемый в данном документе термин «ассоциированное с APP заболевание» представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано или ассоциировано экспрессией гена APP или продуцированием белка APP. Термин «ассоциированное с APP заболевание» включает заболевание, нарушение или состояние, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии, репликации гена APP или активности белка. Неограничивающие примеры ассоциированных с APP заболеваний, включают, например, церебральную амилоидную ангиопатию (CAA) и болезнь Альцгеймера (AD), включая, например, семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

Подразумевается, что используемое в данном документе «терапевтически эффективное количество» включает количество средства для RNAi, которое при введении субъекту, имеющему ассоциированное с APP нарушение, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего состояния заболевания или одного или более симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его степени тяжести, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при его наличии, и других индивидуальных особенностей субъекта, подлежащего лечению.

Подразумевается, что используемое в данном документе «профилактически эффективное количество» включает количество средства для RNAi, которое при введении субъекту, имеющему ассоциированное с APP нарушение, является достаточным для предупреждения или уменьшения интенсивности заболевания или одного или более симптомов заболевания. Уменьшение интенсивности заболевания включает замедление прогрессирования заболевания или снижение тяжести заболевания, развивающегося позже. «Профилактически эффективное количество»

может варьироваться в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания, а также анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при его наличии, и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый требуемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, предусмотренном для любого лечения. Средство для RNAi, используемое в способах по настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для достижения приемлемого соотношения польза/риск, принятого для такого лечения.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных, не вызывая чрезмерную токсичность, раздражение, аллергическую реакцию или другие проблемы или осложнения в соответствии с приемлемым соотношением польза/риск.

Используемая в данном документе фраза «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, 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 рассматриваемого соединения от одного органа или части тела к другому органу или части 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. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) виды крахмала, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и

тальк; (8) наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) буферные растворы с определенным pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемообразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки крови, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

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 головного мозга (например, всего головного мозга, или определенных сегментов головного мозга, или определенных типов клеток в головном мозге, таких как, например, нейроны и глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, клетки микроглии)). В некоторых вариантах осуществления «образец, полученный из организма субъекта» относится к крови или плазме крови, взятым из организма субъекта. В дополнительных вариантах осуществления «образец, полученный от субъекта» относится к ткани головного мозга (или составляющим ее компонентам) или ткани сетчатки (или составляющим ее компонентам), полученным от субъекта.

II. Средства для RNAi по настоящему изобретению

В данном документе описаны средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена APP. В одном варианте осуществления средство для RNAi включает молекулы

двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена APP в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек, у которого имеется ассоциированное с APP нарушение, например, церебральная амилоидная ангиопатия (CAA) или болезнь Альцгеймера (AD), включая, например, семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD). dsRNA содержит антисмысловую нить, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии гена APP. Длина участка комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или меньше (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или меньше). После контакта с клеткой, экспрессирующей ген APP, средство для RNAi ингибирует экспрессию гена APP (например, гена APP человека, примата, отличного от примата животного или птицы) на по меньшей мере приблизительно 10%, что установлено с помощью анализа, например ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа на основе анализа белков, такого как иммунофлуоресцентный анализ с использованием, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA содержит две нити РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна нить dsRNA (антисмысловая нить) содержит участок комплементарности, который, практически полностью комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образующейся во время экспрессии гена APP. 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 в данной области техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде самокомплементарных участков одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно длина дуплексной структуры составляет от 15 до 30 пар оснований, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29,

19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. В определенных предпочтительных вариантах осуществления длина дуплексной структуры составляет от 18 до 25 пар оснований, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные для вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

Аналогично, длина участка комплементарности с целевой последовательностью составляет от 15 до 30 нуклеотидов, например, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Также предусматривается, что диапазоны и значения длины, промежуточные для вышеупомянутых диапазонов и значений длины, являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления длина dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 23 нуклеотидов или от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов. Обычно dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно из уровня техники, dsRNA, длина которых составляет более приблизительно 21-23 нуклеотидов, могут служить в качестве субстратов для Dicer. Среднему специалисту в данной области техники 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, длина которой является достаточной, чтобы позволить ей служить субстратом для RNAi-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути с участием RISC).

Специалист в данной области техники также поймет, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например, дуплексный

участок из приблизительно 9-36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексный участок размером более 30 пар оснований, представляют собой dsRNA в тех случаях, когда она процессируется до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который нацеливается на требуемую РНК для расщепления. Таким образом, среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляет собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство для RNAi, применимое для целенаправленного воздействия на экспрессию APP, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

Описанная в данном документе dsRNA может дополнительно содержать один или более однонитевых нуклеотидных выступающих концов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, могут характеризоваться неожиданно более высокими ингибиторными свойствами 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 одной из антисмысловой или смысловой нити dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных из уровня техники и дополнительно обсуждаемых ниже, например, с применением

автоматического синтезатора ДНК, например, такого как коммерчески доступный от Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Средства для RNAi 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 siRNA 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. Однонитевые олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением жидкофазного или твердофазного органического синтеза или их обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой нити может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26, и соответствующая смысловой нити нуклеотидная последовательность антисмысловой нити может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26. 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 APP. В связи с этим, в данном аспекте dsRNA будет содержать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая нить (сопровождающая нить), приведенная в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26, и второй олигонуклеотид описывается как соответствующая смысловой нити антисмысловая нить (направляющая нить), приведенная в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26. Соответственно, в качестве примера последовательностей, образующих дуплексы по настоящему изобретению, явно предполагаются следующие парные наборы из последовательностей смысловой и антисмысловой нитей, приведенных в таблице 3: SEQ ID NO: 855 и 856; SEQ ID NO: 857 и 858; SEQ ID NO: 859 и 860; SEQ ID NO: 861 и 862; SEQ ID NO: 863 и 864; SEQ ID NO: 865 и 866; SEQ ID NO: 867 и 868; SEQ ID NO: 869 и 870; SEQ ID NO: 871 и 872;

SEQ ID NO: 873 и 874; SEQ ID NO: 875 и 876; SEQ ID NO: 877 и 878; SEQ ID NO: 879 и 880; SEQ ID NO: 881 и 882; SEQ ID NO: 883 и 884; SEQ ID NO: 885 и 886; SEQ ID NO: 887 и 888; SEQ ID NO: 889 и 890; SEQ ID NO: 891 и 892; SEQ ID NO: 893 и 894; SEQ ID NO: 895 и 896; SEQ ID NO: 897 и 898; SEQ ID NO: 899 и 900; SEQ ID NO: 901 и 902; SEQ ID NO: 903 и 904; SEQ ID NO: 905 и 906; SEQ ID NO: 907 и 908; SEQ ID NO: 909 и 910; SEQ ID NO: 911 и 912; SEQ ID NO: 913 и 914; SEQ ID NO: 915 и 916; SEQ ID NO: 917 и 918; SEQ ID NO: 919 и 920; SEQ ID NO: 921 и 922; SEQ ID NO: 923 и 924; SEQ ID NO: 925 и 926; SEQ ID NO: 927 и 928; SEQ ID NO: 929 и 930; SEQ ID NO: 931 и 932; SEQ ID NO: 933 и 934; SEQ ID NO: 935 и 936; SEQ ID NO: 937 и 938; SEQ ID NO: 939 и 940; SEQ ID NO: 941 и 942; SEQ ID NO: 943 и 944; SEQ ID NO: 945 и 946; SEQ ID NO: 947 и 948; SEQ ID NO: 949 и 950; SEQ ID NO: 951 и 952; SEQ ID NO: 953 и 954; SEQ ID NO: 955 и 956; SEQ ID NO: 957 и 958; SEQ ID NO: 959 и 960; SEQ ID NO: 961 и 962; SEQ ID NO: 963 и 964; SEQ ID NO: 965 и 966; SEQ ID NO: 967 и 968; SEQ ID NO: 969 и 970; SEQ ID NO: 971 и 972; SEQ ID NO: 973 и 974; SEQ ID NO: 975 и 976; SEQ ID NO: 977 и 978; SEQ ID NO: 979 и 980; SEQ ID NO: 981 и 982; SEQ ID NO: 983 и 984; SEQ ID NO: 985 и 986; SEQ ID NO: 987 и 988; SEQ ID NO: 989 и 990; SEQ ID NO: 991 и 992; SEQ ID NO: 993 и 994; SEQ ID NO: 995 и 996; SEQ ID NO: 997 и 998; SEQ ID NO: 999 и 1000; SEQ ID NO: 1001 и 1002; SEQ ID NO: 1003 и 1004; SEQ ID NO: 1005 и 1006; SEQ ID NO: 1007 и 1008; SEQ ID NO: 1009 и 1010; SEQ ID NO: 1011 и 1012; SEQ ID NO: 1013 и 1014; SEQ ID NO: 1015 и 1016; SEQ ID NO: 1017 и 1018; SEQ ID NO: 1019 и 1020; SEQ ID NO: 1021 и 1022; SEQ ID NO: 1023 и 1024; SEQ ID NO: 1025 и 1026; SEQ ID NO: 1027 и 1028; SEQ ID NO: 1029 и 1030; SEQ ID NO: 1031 и 1032; SEQ ID NO: 1033 и 1034; SEQ ID NO: 1035 и 1036; SEQ ID NO: 1037 и 1038; SEQ ID NO: 1039 и 1040; SEQ ID NO: 1041 и 1042; SEQ ID NO: 1043 и 1044; SEQ ID NO: 1045 и 1046; SEQ ID NO: 1047 и 1048; SEQ ID NO: 1049 и 1050; SEQ ID NO: 1051 и 1052; SEQ ID NO: 1053 и 1054; SEQ ID NO: 1055 и 1056; SEQ ID NO: 1057 и 1058; SEQ ID NO: 1059 и 1060; SEQ ID NO: 1061 и 1062; SEQ ID NO: 1063 и 1064; SEQ ID NO: 1065 и 1066; SEQ ID NO: 1067 и 1068; SEQ ID NO: 1069 и 1070; SEQ ID NO: 1071 и 1072; SEQ ID NO: 1073 и 1074; SEQ ID NO: 1075 и 1076; SEQ ID NO: 1077 и 1078; SEQ ID NO: 1079 и 1080; SEQ ID NO: 1081 и 1082; SEQ ID NO: 1083 и 1084; SEQ ID NO: 1085 и 1086; SEQ ID NO: 1087 и 1088; SEQ ID NO: 1089 и 1090; SEQ ID NO: 1091 и 1092; SEQ ID NO: 1093 и 1094; SEQ ID NO: 1095 и 1096; SEQ ID NO: 1097 и 1098; SEQ ID NO: 1099 и 1100; SEQ ID NO: 1101 и 1102; SEQ ID NO: 1103 и 1104; SEQ ID NO: 1105 и 1106; SEQ ID NO: 1107 и 1108; SEQ ID NO: 1109 и 1110; SEQ ID NO: 1111 и 1112; SEQ ID NO:

1113 и 1114; SEQ ID NO: 1115 и 1116; SEQ ID NO: 1117 и 1118; SEQ ID NO: 1119 и 1120; SEQ ID NO: 1121 и 1122; SEQ ID NO: 1123 и 1124; SEQ ID NO: 1125 и 1126; SEQ ID NO: 1127 и 1128; SEQ ID NO: 1129 и 1130; SEQ ID NO: 1131 и 1132; SEQ ID NO: 1133 и 1134; SEQ ID NO: 1135 и 1136; SEQ ID NO: 1137 и 1138; SEQ ID NO: 1139 и 1140; SEQ ID NO: 1141 и 1142; SEQ ID NO: 1143 и 1144; SEQ ID NO: 1145 и 1146; SEQ ID NO: 1147 и 1148; SEQ ID NO: 1149 и 1150; SEQ ID NO: 1151 и 1152; SEQ ID NO: 1153 и 1154; SEQ ID NO: 1155 и 1156; SEQ ID NO: 1157 и 1158; SEQ ID NO: 1159 и 1160; SEQ ID NO: 1161 и 1162; SEQ ID NO: 1163 и 1164; SEQ ID NO: 1165 и 1166; SEQ ID NO: 1167 и 1168; SEQ ID NO: 1169 и 1170; SEQ ID NO: 1171 и 1172; SEQ ID NO: 1173 и 1174; SEQ ID NO: 1175 и 1176; SEQ ID NO: 1177 и 1178; SEQ ID NO: 1179 и 1180; SEQ ID NO: 1181 и 1182; SEQ ID NO: 1183 и 1184; SEQ ID NO: 1185 и 1186; SEQ ID NO: 1187 и 1188; SEQ ID NO: 1189 и 1190; SEQ ID NO: 1191 и 1192; SEQ ID NO: 1193 и 1194; SEQ ID NO: 1195 и 1196; SEQ ID NO: 1197 и 1198; SEQ ID NO: 1199 и 1200; SEQ ID NO: 1201 и 1202; SEQ ID NO: 1203 и 1204; SEQ ID NO: 1205 и 1206; SEQ ID NO: 1207 и 1208; SEQ ID NO: 1209 и 1210; SEQ ID NO: 1211 и 1212; SEQ ID NO: 1213 и 1214; SEQ ID NO: 1215 и 1216; SEQ ID NO: 1217 и 1218; SEQ ID NO: 1219 и 1220; SEQ ID NO: 1221 и 1222; SEQ ID NO: 1223 и 1224; SEQ ID NO: 1225 и 1226; SEQ ID NO: 1227 и 1228; SEQ ID NO: 1229 и 1230; SEQ ID NO: 1231 и 1232; SEQ ID NO: 1233 и 1234; SEQ ID NO: 1235 и 1236; SEQ ID NO: 1237 и 1238; SEQ ID NO: 1239 и 1240; SEQ ID NO: 1241 и 1242; SEQ ID NO: 1243 и 1244; SEQ ID NO: 1245 и 1246; SEQ ID NO: 1247 и 1248; SEQ ID NO: 1249 и 1250; SEQ ID NO: 1251 и 1252; SEQ ID NO: 1253 и 1254; SEQ ID NO: 1255 и 1256; SEQ ID NO: 1257 и 1258; SEQ ID NO: 1259 и 1260; SEQ ID NO: 1261 и 1262; SEQ ID NO: 1263 и 1264; SEQ ID NO: 1265 и 1266; SEQ ID NO: 1267 и 1268; SEQ ID NO: 1269 и 1270; SEQ ID NO: 1271 и 1272; SEQ ID NO: 1273 и 1274; SEQ ID NO: 1275 и 1276; SEQ ID NO: 1277 и 1278; SEQ ID NO: 1279 и 1280; SEQ ID NO: 1281 и 1282; SEQ ID NO: 1283 и 1284; SEQ ID NO: 1285 и 1286; SEQ ID NO: 1287 и 1288; SEQ ID NO: 1289 и 1290; SEQ ID NO: 1291 и 1292; SEQ ID NO: 1293 и 1294; SEQ ID NO: 1295 и 1296; SEQ ID NO: 1297 и 1298; SEQ ID NO: 1299 и 1300; SEQ ID NO: 1301 и 1302; SEQ ID NO: 1303 и 1304; SEQ ID NO: 1305 и 1306; SEQ ID NO: 1307 и 1308; SEQ ID NO: 1309 и 1310; SEQ ID NO: 1311 и 1312; SEQ ID NO: 1313 и 1314; SEQ ID NO: 1315 и 1316; SEQ ID NO: 1317 и 1318; SEQ ID NO: 1319 и 1320; SEQ ID NO: 1321 и 1322; SEQ ID NO: 1323 и 1324; SEQ ID NO: 1325 и 1326; SEQ ID NO: 1327 и 1328; SEQ ID NO: 1329 и 1330; SEQ ID NO: 1331 и 1332; SEQ ID NO: 1333 и 1334; SEQ ID NO: 1335 и 1336; SEQ ID NO: 1337 и 1338; SEQ ID NO: 1339 и

1340; SEQ ID NO: 1341 и 1342; SEQ ID NO: 1343 и 1344; SEQ ID NO: 1345 и 1346; SEQ ID NO: 1347 и 1348; SEQ ID NO: 1349 и 1350; SEQ ID NO: 1351 и 1352; SEQ ID NO: 1353 и 1354; SEQ ID NO: 1355 и 1356; SEQ ID NO: 1357 и 1358; SEQ ID NO: 1359 и 1360; SEQ ID NO: 1361 и 1362; SEQ ID NO: 1363 и 1364; SEQ ID NO: 1365 и 1366; SEQ ID NO: 1367 и 1368; SEQ ID NO: 1369 и 1370; SEQ ID NO: 1371 и 1372; SEQ ID NO: 1373 и 1374; SEQ ID NO: 1375 и 1376; SEQ ID NO: 1377 и 1378; SEQ ID NO: 1379 и 1380; SEQ ID NO: 1381 и 1382; SEQ ID NO: 1383 и 1384; SEQ ID NO: 1385 и 1386; SEQ ID NO: 1387 и 1388; SEQ ID NO: 1389 и 1390; SEQ ID NO: 1391 и 1392; SEQ ID NO: 1393 и 1394; SEQ ID NO: 1395 и 1396; SEQ ID NO: 1397 и 1398; SEQ ID NO: 1399 и 1400; и SEQ ID NO: 1401 и 1402. Аналогично также явно предполагаются попарные комбинации смысловой и антисмысловой нитей, представленных в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26 по настоящему изобретению, включая, например, смысловую нить, выбранную из таблицы 2A, вместе с антисмысловой нитью, выбранной из таблицы 2B, или наоборот, и т. д.

В одном варианте осуществления практически полностью комплементарные последовательности dsRNA содержатся на отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически полностью комплементарные последовательности dsRNA содержатся на одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что, хотя последовательности, приведенные в таблицах 2A, 2B, 5A, 5B, 9, 10, 12, 14, 16A, 16B и 26, описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК средства для RNAi по настоящему изобретению, например, dsRNA по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано в них.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что dsRNA, имеющие дуплексную структуру из приблизительно 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были расценены как особенно эффективные в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, (2001) *EMBO J.*, 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 вариантах описанных выше осуществления, с

учетом природы олигонуклеотидных последовательностей, предусмотренных в данном документе, dsRNA, описанные в данном документе, могут содержать по меньшей мере одну нить длиной как минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно ожидать, что более короткие дуплексы за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут характеризоваться аналогичной эффективностью по сравнению с dsRNA, описанными выше. Следовательно, в объеме настоящего изобретения предусматриваются dsRNA, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, предусмотренных в данном документе, и отличающиеся своей способностью ингибировать экспрессию гена APP на не более чем приблизительно 5, 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования, свойственного dsRNA, содержащей полную последовательность.

В дополнение, РНК, описанные в данном документе, идентифицируют сайт(-ы) в транскрипте APP, которые восприимчивы к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены средства для RNAi, которые нацеливаются в пределах этого(-их) сайта(-ов). Говорится, что используемое в данном документе средство для RNAi нацеливается в пределах конкретного сайта РНК-транскрипта, если средство для RNAi содействует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах данного конкретного сайта. Обычно такое средство для RNAi будет содержать по меньшей мере приблизительно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, предусмотренных в данном документе, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в гене APP.

Средство для RNAi, описанное в данном документе, может содержать одно или более ошибочных спариваний с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления средство для RNAi, описанное в данном документе, содержит не более 3 ошибочных спаривания. В определенных вариантах осуществления, если антисмысловая нить средства для RNAi содержит ошибочные спаривания с целевой последовательностью, то положение ошибочного спаривания необязательно может ограничиваться последними 5 нуклеотидами от 5′- или 3′-конца участка комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления в случае средства для RNAi из 23 нуклеотидов нить, которая комплементарна участку гена APP, обычно не

содержит ошибочное спаривание в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения того, является ли средство для RNAi, содержащее ошибочное спаривание с целевой последовательностью, эффективным в ингибировании экспрессии гена APP. Рассмотрение эффективности средств для RNAi с ошибочными спариваниями в ингибировании экспрессии гена APP является важным, особенно, если известно, что для конкретного участка комплементарности в гене APP характерна изменчивость в виде полиморфных последовательностей в пределах популяции.

III. Модифицированные средства для RNAi по настоящему изобретению

В одном варианте осуществления РНК средства для RNAi по настоящему изобретению, например dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные из уровня техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК средства для RNAi по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной с целью улучшения стабильности или других полезных характеристик. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения практически все нуклеотиды средства для RNAi по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды средства для RNAi по настоящему изобретению являются модифицированными. Средства для RNAi по настоящему изобретению, в которых «практически все нуклеотиды являются модифицированными» являются большей частью модифицированными, но не абсолютно полностью модифицированными, и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида. В еще одних вариантах осуществления настоящего изобретения средства для RNAi по настоящему изобретению могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 модифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, представленные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, таких 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, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи и т. д.); модификации оснований, например, замену на стабилизирующие основания, нарушающие стабильность основания или основания, которые образуют пару оснований с расширенным спектром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгацию оснований; модификации сахаров (например, по 2′-положению или 4′-положению) или замену сахара; и/или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Специфические примеры средств для RNAi, 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 данной области техники модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированное средство для RNAi будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3′-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3′-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, 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 вышеупомянутых фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109;

6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 и патентный документ 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, смесью гетероатомов и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные сахарной частью нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей, представляющих собой N, O, S и CH_2.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение вышеупомянутых олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления для применения в средствах для RNAi предусматриваются подходящие РНК-миметики, у которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е остов, нуклеотидных структурных единиц, заменены новыми группами. Структурные единицы в виде оснований сохранены для гибридизации с соответствующим целевым соединением, представляющим собой нуклеиновую кислоту. Одно такое олигомерное соединение, РНК-миметик, который, как было показано, характеризуется превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (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. Иллюстративные 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 средствах для RNAi по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают молекулы 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(метилимино) или MMI-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 фосфодиэфирной 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 более замещенных сахарных фрагментов. Средства для RNAi, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать в 2′-положении одно из следующего: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10}алкил или C_2-C_{10}алкенил и алкинил. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH_2)$_n$O]$_m$$CH_3$, O($CH_2$).$_nOCH_3$, O($CH_2$)$_n$$NH_2$, O($CH_2$)$_n$$CH_3$, O($CH_2$)$_nONH_2$ и O(CH_2)$_n$ON[(CH_2)$_n$$CH_3$)]$_2$, где n и m составляют от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат в 2′-положении одно из следующего: низший C_1-C_{10}алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, расщепляющую РНК группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств средства для RNAi или группу для улучшения фармакодинамических свойств средства для RNAi и другие заместители

с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2′-метоксиэтокси (2′-O--$CH_2CH_2OCH_3$, также известный как 2′-O-(2-метоксиэтил) или 2′-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2′-диметиламинооксиэтокси, т. е. группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, 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_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5м-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_3), 2′-аминопропокси (2м-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$), 2′-*O*-гексадецил и 2′-фтор (2′-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях РНК средства для RNAi, в частности в 3′-положении сахара в 3′-концевом нуклеотиде или в молекулах dsRNA с 2′-5′-связями и в 5′-положении 5′-концевого нуклеотида. Средства для RNAi также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутильные фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, некоторые из которых принадлежат авторам настоящей заявки. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Средство для RNAi по настоящему изобретению 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 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие

алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и цитозин, 5-пропинилурацил и цитозин, 6-азоурацил, 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-дезазагуанин и 7-дезазааденин, а также 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в Englisch *et al.*, (1991) *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613, и раскрытые в Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и O-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., dsRNA 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′-O-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложено получение определенных из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают без ограничения вышеупомянутые патенты США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Средство для RNAi по настоящему изобретению также может быть модифицировано таким образом, чтобы содержать одну или более 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 siRNA повышает стабильность siRNA 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).

Средство для RNAi по настоящему изобретению также может быть модифицировано таким образом, чтобы содержать один или более 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 более 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′-CH2-O-2′. Эта структура эффективно «запирает» рибозу в структурной конформации 3′-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA 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 более бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4′-2′. Примеры таких бициклических нуклеозидов с мостиком 4′-2′ включают без ограничения 4′-(CH2)—O-2′ (LNA); 4′-(CH2)—S-2′; 4′-(CH2)2—O-2′ (ENA); 4′-CH(CH3)—O-2′ (также называемый «конформационно затрудненный этилом» или «cEt») и 4′-CH(CH2OCH3)—O-2′ (и его аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4′-C(CH3)(CH3)—O-2′ (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4′-CH2—N(OCH3)-2′ (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4′-CH2—O—N(CH3)-2′ (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4′-CH2—N(R)—O-2′, где R представляет собой H, C1-C12алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4′-CH2—C(H)(CH3)-2′ (см., например, Chattopadhyaya *et al., J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134) и 4′-CH2—C(=CH2)-2′ (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и публикации заявок на патент США, в которых изложено получение нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие: патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133;7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

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

Средство для RNAi по настоящему изобретению также может быть модифицировано таким образом, чтобы содержать один или более затрудненных этилом нуклеотидов. Используемый в данном документе «затрудненный этилом нуклеотид» или «cEt» представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4′-CH(CH3)-O-2′. В одном варианте осуществления затрудненный этилом нуклеотид находится в S-конформации, обозначаемой в данном документе как «S-cEt».

Средство для RNAi по настоящему изобретению может также содержать один или более «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 обеспечения стабильности и аффинности, что приводит к меньшему «сморщиванию» рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых изложено получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают без ограничения публикацию заявки на патент 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 средство для RNAi по настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды типа UNA (незапертая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незапертую ациклическую нуклеиновую кислоту, при этом в сахарном фрагменте была удалена какая-либо из связей 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 была удалена связь C2′-C3′ (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2′ и C3′) в сахарном фрагменте (см. *Nuc. Acids Symp. Series,* 52, 133-134 (2008), и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.,* 2009, 10, 1039, включенные настоящим посредством ссылки).

Иллюстративные патентные публикации США, в которых изложено получения UNA, включают без ограничения патент США № 8314227 и публикации заявки на патент США №№ 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждой из которых настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Потенциальные стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-NHAc), N-капроил-4-гидроксипролинол (Hyp-C6), N-ацетил-4-гидроксипролинол (Hyp-NHAc), тимидин-2′-O-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-

амино), 2-докозаноилуридин-3′′-фосфат, инвертированное основание dT (idT) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации согласно PCT № WO 2011/005861.

Другие модификации средства для RNAi по настоящему изобретению включают 5′-фосфат или имитатор 5′-фосфата, например, 5′-концевой фосфат или имитатор фосфата в антисмысловой нити средства для RNAi. Подходящие имитаторы фосфатов раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2012/0157511, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

A. Модифицированные средства для RNAi, содержащие мотивы по настоящему изобретению

В определенных аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi по настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в WO 2013/075035, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Как показано в данном документе и в публикации согласно PCT № WO 2013/075035, превосходный результат можно получать за счет введения одного или более мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства для RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для RNAi могут быть полностью модифицированными иным образом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для RNAi может быть необязательно конъюгировано с C16-лигандом, например, на смысловой нити. Средство для RNAi может быть необязательно модифицировано с помощью модификации, представляющей собой (*S*)-гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), например, одного или более остатков антисмысловой нити. Полученные средства для RNAi демонстрируют превосходную активность сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi полностью модифицированы таким образом, чтобы содержать один или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления

по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, тогда активность средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены двухнитевые средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена APP) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Длина каждой нити средства для RNAi может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой нити может составлять 14-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-21нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухнитевой РНК-дуплекс («dsRNA»), также называемый в данном документе «средством для RNAi». Длина дуплексного участка средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30 пар нуклеотидов, 17-30 пар нуклеотидов, 27-30 пар нуклеотидов, 17-23 пары нуклеотидов, 17-21 пару нуклеотидов, 17-19 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 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или более участков выступающего конца и/или кэппирующих групп на 3′-конце, 5′-конце или на обоих концах одной или обеих нитей. Длина выступающего конца может 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. Выступающие концы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или результатом того, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК, или он может быть комплементарен генным 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 одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в участке выступающего конца средства для RNAi независимо может представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая без ограничения с 2′-модифицированным сахаром, такой как 2-F-, 2′-O-метилтимидин (T) и их любые комбинации.

Например, последовательность выступающего конца на каждом конце каждой нити может представлять собой TT. Выступающий конец может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК, или он может быть комплементарен генным последовательностям, подлежащим нацеливанию, или может иметь другую последовательность.

5′- или 3′-выступающие концы на смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитях средства для RNAi могут быть фосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления участок(-и) выступающего конца содержит(-ат) два нуклеотида с фосфотиоатной связью между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления выступающий конец присутствует на 3′-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В некоторых вариантах осуществления такой 3′-выступающий конец присутствует в антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления такой 3′-выступающий конец присутствует в смысловой нити.

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

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

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

В еще одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, длина которого составляет 21 нуклеотид, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2′-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5′-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2′-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5′-конца.

В одном варианте осуществления средство для RNAi 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 трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5′-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2′-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5′-конца, где один конец средства для RNAi 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 находиться две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из 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 RNAi дополнительно содержит 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 каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован с помощью 2′-O-метила или 3′-фтора, например, в виде чередующегося мотива. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (необязательно C16-лиганд).

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нить, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, где начиная с 5′-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1-23 первой нити содержатся по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков, и, начиная с 3′-концевого нуклеотида, она 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, за счет чего образуется одноцепочечный 3′-выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; где 5′-конец антисмысловой нити содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые являются неспаренными со смысловой нитью, вследствие чего образуется одноцепочечный 5′-выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5′-концевые и 3′-концевые нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити при выравнивании смысловой и антисмысловой нити с обеспечением максимальной комплементарности, за счет чего образуется практически полностью дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить является в достаточной степени комплементарной целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой нити, чтобы снижать 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 трех последовательных нуклеотидов, при этом 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 трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для RNAi 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 трех последовательных нуклеотидов в положении 11, 12, 13 от 5′-конца; где 3′-конец первой нити и 5′-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на своем 3′-конце на 1-4 нуклеотида длиннее первой нити, 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 RNAi вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для RNAi под действием Dicer предпочтительно приводит к образованию siRNA, содержащей 3′-конец второй нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в антисмысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi, имеющего дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, сайт расщепления антисмысловой нити находится, как правило, примерно в положениях 10, 11 и 12 от 5′-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14 или положениях 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5′-конца

антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида от 5′-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка средства для RNAi от 5′-конца.

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может иметь по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, 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 одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов. 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, который отделен от мотива, расположенного в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена от него по меньшей мере одним или более нуклеотидами. Если мотивы непосредственно прилегают друг к другу, химическая структура мотивов отличается друг от друга, а если мотивы разделены одним или более нуклеотидами, то химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце относительно первого мотива, расположенного в сайте расщепления или рядом с ним, или на другой стороне от основного мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, 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 более фланкирующих модификаций, которые при выравнивании имеют расположение, подобное фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi, как правило, не включает первый один или два концевых нуклеотида на 3′-конце, 5′-конце или на обоих концах нити.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi, как правило, не включает первый один или два спаренных нуклеотида на 3′-конце, 5′-конце или на обоих концах нити в пределах дуплексного участка.

Если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и перекрываться на один, два или три нуклеотида.

Если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выровнены таким образом, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают 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 одном варианте осуществления средство для RNAi содержит ошибочное(-ые) спаривание(-я) с мишенью, в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может находиться в участке выступающего конца или в дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их свойства 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). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических спаривания (описанные в других разделах данного документа), предпочтительнее канонических спариваний (A:T, A:U, G:C); а спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических спариваний.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований от 5′-конца в пределах дуплексных участков антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и пар с ошибочными спариваниями, например, с неканоническими или отличными от канонического спариваниями или спариваниями, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5′-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления нуклеотид в положении 1 от 5′-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований 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 другом варианте осуществления нуклеотид на 3′-конце смысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3′-конце антисмысловой нити представляет собой дезокситимин (dT). В одном варианте осуществления на 3′-конце смысловой и/или антисмысловой нити присутствует короткая последовательность из дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT.

В одном варианте осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I):

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′ (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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

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

каждый n_p и n_q независимо представляет нуклеотид выступающего конца;

где Nb и Y имеют неодинаковую модификацию; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно все нуклеотиды YYY представляют собой 2′-F-модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив YYY может находиться в сайте расщепления или рядом с ним (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 1-го нуклеотида от 5′-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го 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 оба i 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).

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

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

Если смысловая нить представлена формулой (Ic), N_b представляет 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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

5′ n_p-N_a-YYY- N_a-n_q 3′ (Ia).

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

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

5′ $n_{q'}$-N_a'-(Z′Z′Z′)$_k$-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'-(X′X′X′)$_l$-N'_a-$n_{p'}$ 3′ (II)

где

каждый из k и l независимо составляет 0 или 1;

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

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет нуклеотид выступающего конца;

где N_b' и Y′ имеют неодинаковую модификацию;

и

каждый из X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации в виде чередующегося паттерна.

Мотив Y′Y′Y′ находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, длина которого составляет 17-23 нуклеотида, мотив Y′Y′Y′ может находиться 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 1-го нуклеотида от 5′-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида от 5′-конца в пределах дуплексного участка. Предпочтительно мотив Y′Y′Y′ находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды мотива Y′Y′Y′ представляют собой 2′-OMe-модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления k составляет 1, а l составляет 0, или k составляет 0, а l составляет 1, или оба k и l составляют 1.

Таким образом, антисмысловая нить может быть представлена следующими формулами:

5′ $n_{q'}$-N_a'-Z′Z′Z′-N_b'-Y′Y′Y′-N_a'-$n_{p'}$ 3′ (IIb);

5′ $n_{q'}$-N_a'-Y′Y′Y′-N_b'-X′X′X′-$n_{p'}$ 3′ (IIc) или

5′ $n_{q'}$-N_a'- Z′Z′Z′-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'- X′X′X′-N_a'-$n_{p'}$ 3′ (IId).

Если антисмысловая нить представлена формулой (IIb), N_b' представляет 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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если антисмысловая нить представлена формулой (IIc), N_b' представляет 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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если антисмысловая нить представлена формулой (IId), каждый N_b' независимо представляет 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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b состоит из 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

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

5′ $n_{p'}$-$N_{a'}$-Y′Y′Y′- $N_{a'}$-$n_{q'}$ 3′ (Ia).

Если антисмысловая нить представлена формулой (IIa), каждый N_a' независимо представляет 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 независимо может быть модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, 2′-метоксиэтила, 2′-O-метила, 2′-O-аллила, 2′-C-аллила, 2′-гидроксила или 2′-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2′-O-метила или 2′-фтора. В частности, каждый X, Y, Z, X′, Y′ и Z′ может представлять 2′-O-метил-модификацию или 2′-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 нити, если дуплексный участок состоит из 21 нуклеотида, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5′-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида от 5′-конца в пределах дуплексного участка; а Y представляет 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 содержит 2′-OMe-модификации или 2′-F-модификации.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y′Y′Y′, находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5′-конца, или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида от 5′-конца в пределах дуплексного участка; а Y′ представляет 2′-O-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 содержит 2′-OMe-модификации или 2′-F-модификации.

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 RNAi 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 в средстве для RNAi представлен формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}\,Y\,Y\,Y\,\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\,3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\,5'$ (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 N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

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

где

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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 оба i и j составляют 0; или оба i 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 оба k и l составляют 0; или оба k и l составляют 1.

Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс в средстве для RNAi, 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′ np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na-nq 3′

3′ n_p′-N_a′-Y′Y′Y′-N_b′-Z′Z′Z′-N_a′n_q′ 5′ (IIIb),

5′ np-Na- X X X -Nb -Y Y Y - Na-nq 3′

3′ n_p′-N_a′-X′X′X′-N_b′-Y′Y′Y′-N_a′-n_q′ 5 (IIIc),

5′ np -Na -X X X -Nb-Y Y Y -Nb- Z Z Z -Na-nq 3′

3′ n_p′-N_a′-X′X′X′-N_b′-Y′Y′Y′-N_b′-Z′Z′Z′-N_a-n_q′ 5′ (IIId).

Если средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждый N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если средство для RNAi представлено формулой (IIIb), каждый N_b независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если средство для RNAi представлено формулой (IIIc), каждый N_b, N_b′ независимо представляет 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 олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если средство для RNAi представлено формулой (IIId), каждый N_b, N_b′ независимо представляет 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 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.

В одном варианте осуществления, если средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации. В другом варианте осуществления, если средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2′-O-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 одном варианте осуществления, если средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации, $n_p' >0$, и по меньшей мере один n_p' соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или более C16-фрагментами (или родственными фрагментами), присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). В другом варианте осуществления, если средство для RNAi представлено формулой (IIId), модификации N_a представляют собой 2′-O-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 более C16-фрагментами (или родственными фрагментами), необязательно присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления, если средство для RNAi представлено формулой (IIIa), модификации N_a представляют собой 2′-O-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 более C16-фрагментами (или родственными фрагментами), присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), 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 два различных гена; или каждый из дуплексов может нацеливаться на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), 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 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 RNAi, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), соединены друг с другом на 5′-конце и одном или обоих 3′-концах и 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 различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, 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. В определенных вариантах осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению могут содержать лиганды GalNAc, даже если такие лиганды GalNAc в настоящее время демонстрируют ограниченную ценность для предпочтительного(-ых) пути(путей) доставки интратекально/в ЦНС по настоящему изобретению.

Как описано более подробно ниже, в случае средства для RNAi, которое содержит один или более углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшаться одно или более свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять другим фрагментом, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный

лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более 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 более 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 атому циклического носителя, входящему в состав кольца, например, атому углерода или гетероатому (отличному 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 и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. 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.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; при этом 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 серинолового остова или диэтаноламинового остова.

В определенных конкретных вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, перечисленных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

IV. Нокдаун APP для лечения ассоциированных с APP заболеваний

Определенные аспекты настоящего изобретения направлены на нокдаун, опосредованный средством для RNAi, для лечения ассоциированных с APP заболеваний или нарушений, которые включают CAA и AD, включая наследственную CAA и EOFAD, а также спорадическую AD и/или AD с поздним началом.

Наследственная CAA (hCAA) представляет собой сосудистую протеинопатию, для которой относительно просто и возможно клинически протестировать гипотезу применения терапевтических средств против амилоида. Это тяжелейшее и редкое заболевание, терапии которого в настоящее время не существует. Для клинической валидации лечения hCAA, опосредованного siRNA против APP, имеются как биохимические биомаркеры, так и маркеры визуализации.

Один конкретный тип hCAA, предполагаемый для лечения с применением средств для RNAi по настоящему изобретению, представляет собой hCAA с Aβ «голландского типа», при этом оцениваемая популяция пациентов с ней составляет сотни людей, населяющих, главным образом, Нидерланды и Западную Австралию. Среди ассоциированных с APP заболеваний hCAA уникальна тем, что является исключительно сосудистым заболеванием: при CAA амилоидные фибриллы откладываются в артериолах и капиллярах паренхимы ЦНС и мягкой и паутинной оболочек головного мозга, что приводит к снижению когнитивных функций из-за церебральной ишемии и микрокровоизлияний у субъектов, страдающих от CAA. CAA присутствует у более чем 80% всех субъектов с AD (при этом 25% субъектов с AD

имеют CAA средней или тяжелой степени), и частота CAA возрастает с возрастом субъекта, составляя примерно 50% случаев у пожилых людей возрастом старше 70 лет.

Ниже приведены иллюстративные типы проявления наследственной CAA:

амилоид-бета – спорадическая CAA, HCHWA голландского и итальянского типа, EOFAD, LOAD, трисомия 21;

ABri – семейная британская деменция;

ADan – семейная датская деменция;

цистатин C – HCHWA исландского типа (HCHWA – наследственное кровоизлияние в головной мозг с амилоидозом);

гельсолин – семейный амилоидоз финского типа;

прионный белок – прионная болезнь;

транстиретин – наследственный системный амилоидоз.

Как отмечалось выше, Aβ-hCAA (также известная как APP-hCAA) представляет собой быстро прогрессирующую деменцию, ассоциированную с внутримозговым кровоизлиянием. Известные показания CAA включают как APP-hCAA, так и спорадическую CAA. Возможные дополнительные показания CAA включают: CAA, ассоциированную с EOFAD (PSEN1; APP; PSEN2); CAA, ассоциированную с синдромом Дауна; и CAA, ассоциированную с болезнью Альцгеймера с поздним началом (для которой, как отмечалось выше, характерна широкая распространенность).

В случае APP-hCAA в качестве показания, распространенность APP-hCAA является неизвестной; однако APP-hCAA в чистом виде встречается реже, чем EOFAD (hCAA голландского типа (включающая мутацию APP E693Q) была отмечена у нескольких сотен индивидуумов). Как правило, симптомы APP-hCAA появляются в возрасте от 35 до 45 лет; и, как правило, APP-hCAA прогрессирует до тяжелого CVA в течение 2-5 лет, в результате чего возраст максимальной смертности от CVA составляет 55 лет.

Спорадическая CAA в качестве показания характеризуется относительно высокой распространенностью: это обычная причина лобарного внутримозгового

кровоизлияния (ICH) у пожилых людей. Она также представляет собой быстро прогрессирующее заболевание, при этом у 86 (36%) из 316 пациентов развивался рецидив ICH в течение среднего периода наблюдения, составляющего 5 лет (Van Etten *et al.* 2016 *Neurology*). В одном исследовании кумулятивное число случаев деменции при спорадической CAA составило 14% через 1 год и 73% через 5 лет (Xiong *et al.* 2017 *J Cerebr Blood Flow Metab*). Спорадическая CAA также значительно перекрывается с AD, поскольку у примерно 25% лиц с AD в головном мозге было идентифицировано присутствие CAA на поздних стадиях; однако менее 50% случаев CAA действительно соответствуют патологическим критериям AD.

Для оценки эффективности нокдауна APP у субъекта, получающего лечение средством для RNAi по настоящему изобретению, явно предполагается, что растворимые формы APP, в частности, включая APPα и APPβ, могут служить биомаркерами спинномозговой жидкости (CSF) для оценки эффективности нокдауна APP.

Продуцирование, элиминация и отложение амилоида-β при CAA: комбинированные данные указывают на то, что основным источником Aβ являются нейроны. Он образуется путем последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP) β- и γ-секретазами пропорционально активности нейронов. Aβ элиминируется из головного мозга с помощью четырех основных путей: (a) протеолитического расщепления под действием эндопептидаз (таких как неприлизин и разрушающий инсулин фермент (IDE)); (b) опосредованного рецепторами клиренса клетками паренхимы головного мозга (микроглией, астроцитами и, в меньшей степени, нейронами); (c) активного транспорта в кровь через гематоэнцефалический барьер (BBB); (d) элиминации по ходу периваскулярных путей, по которым интерстициальная жидкость дренируется из головного мозга. Специализированные переносчики (например, ApoE) и/или механизмы рецепторного транспорта (например, рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR) и белок, подобный LDLR (LRP1)) участвуют во всех основных путях клеточного клиренса. Сосудистому отложению способствуют факторы, которые увеличивают соотношение Aβ40:Aβ42 (но при этом увеличение Aβ42 приводит к олигомеризации и образованию амилоидных бляшек) и препятствуют периваскулярному прохождению. Поскольку с возрастом механизмы клиренса становятся менее эффективными, Aβ все больше захватывается из периваскулярных путей дренирования в базальные мембраны капилляров и артериол головного мозга,

что приводит к CAA. Аллели ApoE по-разному влияют на различные молекулярные и клеточные процессы продуцирования, элиминации и отложения Aβ, так что они либо увеличивают, либо уменьшают риск развития CAA (Charidimou A *et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 124-137).

Последовательное расщепление APP происходит двумя путями. Отмечено, что белки семейства APP имеют крупные, биологически активные, N-концевые эктодомены, а также более короткий C-конец, который содержит критически важный домен сортировки белка с последовательностью тирозин-глутаминовая кислота-аспарагин-пролин-треонин-тирозин (YENPTY; SEQ ID NO: 1863), с которым связываются адаптерные белки X11 и Fe65. Образованный продукт расщепления, пептид Aβ, начинается в пределах эктодомена и продолжается в трансмембранном участке. При осуществлении неамилоидогенного процессинга APP в одном пути APP расщепляется под действием α-секретазы, а затем γ-секретазы. Амилоидогенный процессинг APP во втором пути включает расщепление под действием BACE1, за затем γ-секретазы. Оба процесса приводят к образованию растворимых эктодоменов (sAPPα и sAPPβ) и идентичных внутриклеточных C-концевых фрагментов (AICD; SEQ ID NO: 1864; Thinakaran and Koo. *J. Biol. Chem.* 283: 29615–19; Reinhard *et al. The EMBO Journal*, 24: 3996-4006; Walsh *et al. Biochemical Society Transactions*, 35: 416-420; O′Brien and Wong. Annu Rev Neurosci. 34: 185-204).

Гистопатология CAA включает морфологические изменения стенок сосудов (выявляемые при окрашивании гематоксилином-эозином) и отложение Aβ. В лептоменингеальных артериолах наблюдали значительные изменения структуры и образование «двуствольных» сосудов (Charidimou *et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 124-137). При CAA легкой и умеренной степени были выявлены только минимальные изменения структуры; однако при CAA на поздних стадиях были выявлены значительные изменения, наиболее серьезным из которых было образование «двуствольных» сосудов (отделение и расслоение внешней части средней оболочки). Аналогичный диапазон патологических изменений, связанных с CAA, в лептоменингеальных артериолах также наблюдали с использованием иммуногистохимического выявления Aβ. При CAA легкой степени в стенке исследованных сосудов наблюдали очаговое отложение амилоида. При CAA умеренной степени показано более плотное отложение амилоида, которое охватывает

всю стенку сосуда, в то время как при CAA тяжелой степени показаны «двухстволъные» сосуды и вовлечение эндотелия. Результаты патологоанатомического исследования CAA в кортикальных артериолах выявили прогрессирующее отложение Aβ пропорционально тяжести заболевания. Для CAA умеренной степени показано панмуральное отложение Aβ вместе с отложением Aβ в окружающей паренхиме головного мозга, в то время как при CAA тяжелой степени наблюдалось образование «двуствольного» сосуда, хотя это было менее распространено по сравнению с лептоменингеальными сосудами (Charidimou *et al.*).

Также был изучен патогенез CAA. Бета-амилоид, продуцируемый паренхимой головного мозга, обычно выводится периваскулярным путем. Было обнаружено, что избыточное продуцирование Aβ при экспрессии специфических вариантов Aβ, приводящих к предрасположенности к CAA, и замедленное выведение Aβ приводят к отложению амилоида в средней оболочке мелких артерий в ЦНС. Было установлено, что растворимые и нерастворимые амилоидные фибриллы токсичны для гладкой мускулатуры сосудов, и такие фибриллы заменяют эти клетки, нарушая реактивность сосудов. Было обнаружено, что дальнейшее повреждение эндотелия приводит к микрокровоизлияниям, микроинфарктам и разрушению тканей, что приводит к деменции. Дальнейшее прогрессирование вызывало внутримозговое кровоизлияние, которое, как было обнаружено, зачастую приводило к летальному исходу. Было обнаружено, что CAA чаще всего возникает в затылочной доле, реже в гиппокампе, мозжечке, базальных ганглиях и обычно не в глубоких центральных отделах серого вещества, белом веществе подкорковых отделов и стволе мозга (Charidimou *et al.*).

Для проведения исследований CAA у человека были установлены многие потенциальные маркеры исхода. Кроме симптоматического внутримозгового кровоизлияния с тяжестью и прогрессированием заболевания были ассоциированы микрокровоизлияния, гиперинтенсивность белого вещества (WMH) и визуализация амилоида (Greenburg *et al., Lancet Neurol* 13: 419-28).

Доступные анализы также можно применять для определения уровней растворимого APP в образцах CSF человека. В частности, sAPPα и sAPPβ представляют собой растворимые формы APP, и было обнаружено, что они могут служить PD (фармакодинамических) биомаркерами. Аналиты также были обнаружены в образцах CSF отличных от человека приматов (NHP), и такие анализы могут способствовать

проведению исследований эффективности у NHP. Также было описано выявление пептидов Aβ40/42/38 и общего тау-белка/тау-белка P181, и его используют в современных исследованиях.

Для исследований CAA также доступны биомаркеры визуализации, поскольку было обнаружено, что функционирование сосудов головного мозга отражает патологию CAA. Визуализацию специфически применяли для измерения сигнала, зависимого от уровня кислорода в крови (BOLD), после проведения визуальной стимуляции (Van Opstal et al., The lancet Neurology; 16 (2); 2017; Peca S et al., Neurology. 2013; 81(19); Switzer A et al., NeuroImage Clinical; 2016). При осуществлении fMRI с измерением BOLD у субъектов с CAA (оценка группы ответов, зависящих от уровня кислорода в крови, в ходе функциональной MRI при выполнении двигательных и зрительных задач) у пациентов с CAA наблюдали сниженную активацию в ходе функциональной MRI. В частности, наблюдали, что активность BOLD в ходе fMRI в зрительной коре коррелирует с более высоким объемом WMH и большим количеством микрокровоизлияний (Peca *et al.*, *Neurology* 2013; 81(19); Switzer *et al. NeuroImage Clinical* 2016).

Также были описаны животные модели CAA, которые обеспечивают возможность определения эффекта нокдауна APP на патологию CAA и обнаружения транслируемых биомаркеров. В частности, были разработаны несколько моделей на грызунах, которые экспрессируют мутантный APP человека и демонстрируют патологический процесс CAA, в том числе Tg-SwDI/NOS2-/-. У модельных мышей Tg-SwDI/NOS2-/- повышение уровней Aβ обнаруживали по мере увеличения возраста модельных мышей. Периваскулярный гиперфосфорилированный тау-белок также был ассоциирован с капиллярным амилоидом не только у мышей Tg-SwDI/NOS2-/-, но также и в образцах от человека с CAA 1 типа (Hall and Roberson. Brain Res Bull. 2012; 88(1): 3–12; Attems et al., Nephrology and Applied Neurobiology, 2011, 37, 75-93). У модели AD на мышах CVN (APPSDI/NOS2 KO) также проявлялись фенотипы, включая амилоидные бляшки в гиппокампе, таламусе и коре головного мозга, усиленное воспаление тканей и поведенческие дефициты. Также была разработана трансгенная модель на крысах (несущих мутации hAPP).

Таким образом, APP был идентифицирован в качестве мишени при лечении наследственной церебральной амилоидной ангиопатии (CAA). Мутации в APP,

которые, как сообщается, вызывают тяжелые формы CAA, включают A692G (фламандский тип), E693Q (голландский тип), E693K (итальянский тип) и D694N (тип Айова). При этом мутации в APP, которые были описаны как вызывающие AD с ранним началом, включают E665D, K670N, M671L (шведский тип), T714A (иранский тип), T714I (австрийский тип), V715M (французский тип), V715A (немецкий тип), I716V (тип Флорида), I716T, V717I (тип Лондон), V717F, V717G и V717L. В частности, мутация E693Q в APP (голландский тип) вызывает тяжелую CAA с небольшим количеством нейрофибриллярных клубков в паренхиме; E693Q приводит к увеличению агрегации и токсичности бета-амилоида; E693K (итальянский тип) является аналогичной, а мутации E693G (арктический тип), E693A и E693-дельта вызывают EOFAD с незначительной степенью CAA или без нее; и D694N APP (тип Айова) вызывает тяжелую CAA с типичной патологией AD. Было обнаружено, что помимо предыдущих точечных мутаций отложение Aβ также вызывают дупликации APP, которые приводят к сверхэкспрессии APP. При этом не было описано никаких известных мутаций в APP, которые предупреждают или задерживают развитие APP-hCAA. В дополнение к мутантам APP при CAA с Aβ также наблюдали мутации PSEN1 (L282V) и PSEN2 (N141I). При этом ApoE ε2 (независимый от AD) и ApoE ε4 (зависимый от AD) также сообщались как факторы риска для развития CAA (Rensink A *et al.*, *Brain Research Reviews*, 43 (2) 2003).

В определенных аспектах настоящего изобретения предусматривается нацеливание на APP для осуществления его нокдауна у индивидуумов, имеющих APP-hCAA. Существует потребность в таких средствах, поскольку в настоящее время отсутствуют модифицирующие заболевание виды терапии CAA. В определенных вариантах осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению должны обеспечивать примерно 60-80% нокдаун с точки зрения уровней как мутантного APP, так и APP WT во всех областях ЦНС.

Люди, гетерозиготные по мутациями APP, существуют в общей популяции с показателем pLI, составляющим 0,3; однако нокаут APP у человека до настоящего времени не выявлен.

Фармакологические попытки лечения CAA у человека включают следующие препараты.

Использование понезумаба, антитела к бета-амилоиду 40, компания Pfizer исследовала на 36 индивидуумах с CAA с поздним началом. Три инфузии понезумаба или плацебо в течение 60 дней оценивали с точки зрения изменений реактивности сосудов головного мозга, измеренной с помощью fMRI с измерением BOLD, а также с точки зрения отека головного мозга, инфарктов, содержания Aβ, изменения когнитивных функций и других вторичных исходов. Понезумаб продемонстрировал различия между применением лекарственного средства и плацебо, но не соответствовал критериям первичной конечной точки.

BAN2401-. Установили, что терапевтические антитела к бета-амилоиду, вводимые системно, являются безопасными, однако также могли вызывать локальный отек головного мозга. В недавнем 18-месячном исследовании II фазы применения BAN2401 при LOAD частота SAE составила 17,6% для плацебо и 15,5% для самой высокой дозы (10 мг/кг один раз в две недели). Аномалии при визуализации, связанные с амилоидом – отек (ARIA-E) составляли 14,6% при самой высокой дозе у носителей APOE4.

Что касается животных моделей CAA, было отмечено, что понезумаб был эффективен на мышиной модели CAA с точки зрения снижения нагрузки бета-амилоида и реактивности сосудов (Bales, 2018). При этом мыши с полным нокаутом APP также были признаны жизнеспособными.

Нижеприведенные иллюстративные данные патологоанатомических исследований в отношении биомаркера также предоставили дополнительное подтверждение главной роли бета-амилоидного белка в патогенезе CAA:

наблюдалось, что наследственные формы CAA в «чистом виде» (т. е. без амилоидных бляшек в паренхиме) характеризовались преобладающим отложением Aβ40 в амилоиде, в отличие от отложения Aβ42 в паренхиме при AD;

наблюдалось, что CAA не является «таупатией», поскольку характеризуется нормальными уровнями T-тау-белка и P-тау-белка в CSF, в отличие от повышенных уровней, наблюдаемых при AD;

было идентифицировано, что обратная корреляция увеличения амилоидной нагрузки в головном мозге, измеренной с помощью PET с PiB, со снижением уровней Aβ40 в CSF является уникальным признаком CAA; и

данные экспериментов *in vitro* и *in vivo* предоставили возрастающую поддержку прионной гипотезы CAA, согласно которой Aβ40, содержащий мутации, характерные для наследственной CAA, склонен к ошибочной укладке и индуцированию ошибочной укладки белка WT, вследствие чего оба присутствуют в амилоидных фибриллах (аналогично транстиретину (TTR)).

Как раскрыто в нижеприведенных примерах, в настоящем изобретении предусмотрен ряд перекрестно-реактивных дуплексов, нацеливающихся на APP мыши/крысы (включая, например, AD-397177, AD397192, AD-397196, AD-397182, AD397190, AD-397265 и AD- 397203), исходя из результатов скрининга мРНК APP в печени при введении дуплексов в однократной дозе 2 мг/кг и оценке в день 21 после введения дозы. В настоящем изобретении также предусмотрен ряд перекрестно-реактивных дуплексов для белка человека/яванского макака (включая, например, AD-392911, AD-392912, AD-392703, AD-392866, AD-392927, AD-392913, AD-392843, AD- 392916, AD-392714, AD-392844, AD-392926, AD-392824, AD-392704 и AD-392790), исходя из результатов скрининга, полученных при обработке первичных гепатоцитов яванского макака и клеток BE(2)C человека.

Также явно предполагается осуществление нокдауна, опосредованного средством для RNAi, для лечения EOFAD. EOFAD, подобно hCAA, является тяжелейшим и редким заболеванием, и, как и в случае hCAA, этиологическая роль APP хорошо установлена, и фенотипирование заболевания может быть выполнено с большей точностью и в течение более короткого периода времени, чем, например, для спорадической AD и/или AD с поздним началом (необязательно AD с поздним началом с тяжелой CAA в качестве подкласса AD с поздним началом). EOFAD представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание с деменцией у молодых взрослых людей, возраст которых при дебюте заболевания составляет менее 60-65 лет и зачастую менее 55 лет.

Согласно оценкам распространенность EOFAD составляет 41,2 на 100000 среди группы риска (т. е. лиц возрастом 40-59 лет), при этом 61% пораженных EOFAD имеют положительный семейный анамнез EOFAD (среди них, у 13% пораженные индивидуумы встречались в трех поколениях). EOFAD составляет менее 3% от всех AD (Bird, Genetics in Medicine, 10: 231–239; Brien and Wang. Annu Rev Neu Sci, 2011, 34: 185-204; NCBI Gene Reviews).

При проведении генетической валидации у человека мишени APP (OMIM 104300) были идентифицированы определенные мутации APP, вызывающие EOFAD, включая E665D, K670N, M671L (шведский тип), T714A (иранский тип), T714I (австрийский тип), V715M (французский тип), V715A (немецкий тип), I716V (тип Флорида), I716T, V717I (тип Лондон), V717F, V717G и V717L, как описано выше. Помимо этого были идентифицированы доминантные мутации белка-предшественника бета-амилоида, которые вызывают EOFAD и CAA.

Без привязки к какой-либо теории полагают, что патогенез AD начинается в гиппокампе, гребне серого вещества, расположенном непосредственно над обоими боковыми желудочками. Считается, что дегенерация этой ткани вызывает потерю памяти, характерную для ранней стадии заболевания. Хотя механизм нейродегенерации на белковом уровне является предметом значительных споров, ассоциированные с EOFAD дупликации APP показали, что сверхэкспрессии APP может быть достаточно, чтобы вызвать AD. (Haass and Selkoe. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8: 101-112).

В отличие от EOFAD и CAA, патогенетические механизмы спорадической AD еще не изучены, и группа пациентов с клинически определяемой спорадической AD, вероятно, является гетерогенной по механизму развития.

В определенных аспектах настоящего изобретения предусматривается нацеливание на APP для осуществление его нокдауна у индивидуумов, имеющих EOFAD. Существует потребность в таких средствах, поскольку для AD в целом и EOFAD в частности существуют только симптоматические виды лечения (с ограниченной эффективностью). В определенных вариантах осуществления средства для RNAi по настоящему изобретению должны обеспечивать примерно 60-80% нокдаун с точки зрения уровней как мутантного APP, так и APP WT во всех областях ЦНС. Еще одно наблюдение из области генетики человека, которое указывает на вероятную терапевтическую эффективность нацеливающейся на APP терапии, которая способна приводить к нокдауну уровней APP в клетках ЦНС, заключается в том, что была идентифицирована мутация A673T, которая защищала носителей от AD и деменции в общей популяции (Jonsson *et al. Nature Letter*, 488. doi:10.1038/nature11283). Замена A673T расположена рядом с сайтом расщепления для β-секретазы и, как было описано, приводит к 40% снижению уровня бета-амилоида в клеточных анализах. Таким образом, по-видимому, доминантная отрицательная точечная мутация в APP защищает

семьи от AD, что дополнительно подтверждает то, что опосредованный средством для RNAi нокдаун APP может вызывать аналогичный защитный и/или терапевтический эффект при по меньшей мере некоторых формах AD, включая EOFAD.

Содействуя начальным стадиям разработки средства для RNAi, нацеливающегося на APP, было отмечено, что мыши с нокаутом APP являются жизнеспособными (OMIM 104300), что, как ожидается, позволит эффективно использовать мышь в качестве модельной системы во время разработки лидерных соединений. В отличие от мышей, нокаут APP у человека до настоящего времени не выявлен, хотя в общей популяции встречаются люди, гетерозиготные по мутации APP, при показателе EXAC, составляющем 0,3. Биомаркеры, доступные для разработки нацеливающихся на APP средств для RNAi, включают пептиды APP и MAPT в CSF, которые должны обеспечивать возможность быстрой оценки и применимой эффективности даже в генетически однородной популяции (Mo *et al.* (2017) Alzheimers & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring, 6: 201-209).

Как отмечено выше, попытки лечения спорадических форм AD и EOFAD к настоящему времени оказались безуспешными – например, пока не увенчались успехом все испытания ингибиторов BACE1 (β-секретазы) (BACE1i) для лечения спорадической AD (Egan et al. al. *The New England Journal of Medicine*, 378: 1691-1703; Hung and Fu. *Journal of Biomedical Science*, 24: 47). При таком тестировании BACEi отсутствуют завершенные исследования в генетически определенных популяциях (исследования только начаты). Примечательно, что последнее исследование BACE1i показало, что верубецестат снижал уровни бета-амилоида на 60% в популяции, выбранной на основе возраста и клинических критериев, которые предполагают вероятный диагноз AD (Egan et al. *The New England Journal of Medicine*, 378: 1691-1703; Hung and Fu. *Journal of Biomedical Science*, 24: 47). При этом среди средств иммунотерапии с направленным действием на Aβ одно такое средство иммунотерапии продемонстрировало подтверждение механизма действия в недавнем испытании лечения спорадической AD, что поддержало начало продолжающегося испытания III фазы (Selkoe and Hardy. *EMBO Molecular Medicine*, 8: 595-608). С учетом ее роли в расщеплении APP, γ-секретаза также была целевым объектом в определенных испытаниях, направленных на лечение AD. Однако до настоящего времени испытания ингибиторов γ-секретазы в генетически

определенной популяции не были завершены; а несколько программ было прекращено в связи с токсичностью (Selkoe и Hardy).

Следовательно, существует потребность в средствах, которые могут лечить или предупреждать ассоциированные с APP заболевания или нарушения у пораженного индивидуума.

Явно предполагается, что средства для RNAi по настоящему изобретению, в конечном итоге, могут нацеливаться на все ассоциированные с APP заболевания или нарушения, в частности, также предусматривается нацеливание средств для RNAi по настоящему изобретению на спорадическую CAA и спорадическую AD и/или AD с поздним началом, даже с учетом проблем диагностики/фенотипирования этих конкретных ассоциированных с APP заболеваний, с которыми сталкиваются в настоящее время (также предполагается, что диагностика этих заболеваний также будет продолжать улучшаться).

V. Средства для RNAi, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК средства для RNAi по настоящему изобретению предусматривает химическое связывание РНК с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, распределение в клетках или захват средства для RNAi клетками. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестериновый фрагмент (Letsinger *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acid. Sci. USA*, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan *et al.*, (1994) *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-тритилтиол (Manoharan *et al.*, (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:306-309; Manoharan *et al.*, (1993) *Biorg. Med. Chem. Let.*, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20:533-538), алифатическая цепь, например, додекандиоловые или ундециловые остатки (Saison-Behmoaras *et al.*, (1991) *EMBO J*, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, (1990) *FEBS Lett.*, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, (1993) *Biochimie*, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan *et al.*, (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654; Shea *et al.*, (1990) *Nucl. Acids Res.*, 18:3777-3783), полиамин или полиэтиленгликолевая цепь (Manoharan *et al.*, (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14:969-973) или адамантануксусная кислота (Manoharan *et al.*, (1995) *Tetrahedron Lett.*, 36:3651-3654),

пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, 1264: 229-237), или октадециламиновый или гексиламино-карбонил-оксихолестериновый фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни средства для RNAi, 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 органного компартмента, ткани, органа или участка тела, как, например, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать 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-ацетилглюкозамин, 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 (HMPA), 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 полиамина 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 определенных типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиреотропин,

меланотропин, лектин, гликопротеин, сурфактантный белок A, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, витамин A, биотин или RGD-пептид или миметик RGD-пептида.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-O-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин, а также пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), вещества, способствующие транспорту/всасыванию (например, аспирин, витамин E, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu3+ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении колиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка ЦНС. 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.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать захват средства для RNAi в клетку, например, за счет разрушения цитоскелета клетки, например, за счет разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления описанный в данном документе лиганд, присоединенный к средству для RNAi, действует в качестве фармакокинетического модулятора (PK-модулятор). PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т. д. Иллюстративные PK-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат несколько 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 PK-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются с компонентами сыворотки крови (например, сывороточными белками), также пригодны для применения в качестве PK-модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных в данном документе.

Конъюгированные с лигандами олигонуклеотиды 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 множества защитных групп, или лигандами, которые имеют связывающий фрагмент, присоединенный к ним.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно удобно и привычно получать благодаря хорошо известной методике твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализуют несколько фирм-производителей, включая, например, Applied Biosystems (Фостер Сити, Калифорния, США). В качестве дополнения или альтернативы можно использовать любые другие средства для 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 олигонуклеотиды и специфические в отношении последовательности связанные нуклеозиды, несущие молекулу лиганда, по настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов, или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников конъюгатов лиганд-нуклеотид или нуклеозид, которые уже несут молекулу-лиганд, или отличных от нуклеозида структурных блоков, несущих лиганд.

Если применяют предшественники конъюгата с нуклеотидом, которые уже несут связывающий фрагмент, как правило, завершают синтез специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов, а затем осуществляют реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. 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 традиционно применяются в олигонуклеотидном синтезе.

А. *Липофильные фрагменты*

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, циклическое, такое как алициклическое, или полициклическое, такое как полиалициклическое соединение, такое как стероид (например, стерол), или линейный или разветвленный алифатический углеводород. Липофильный фрагмент,

как правило, может содержать углеводородную цепь, которая может быть циклической или ациклической. Углеводородная цепь может содержать различные заместители и/или один или более гетероатомов, таких как атом кислорода или азота. Такие липофильные алифатические фрагменты включают без ограничения насыщенные или ненасыщенные C_4-C_{30}углеводороды (например, C_6-C_{18}углеводороды), насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, воски (например, сложные эфиры одноатомных спиртов и жирных кислот и диамидов жирных кислот), терпены (например, C_{10}терпены, C_{15}сесквитерпены, C_{20}дитерпены, C_{30}тритерпены и C_{40}тетратерпены) и другие полиалициклические углеводороды. Например, липофильный фрагмент может содержать C_4-C_{30}углеводородную цепь (например, C_4-C_{30}алкил или алкенил). В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_6-C_{18}углеводородную цепь (например, линейный C_6-C_{18}алкил или алкенил). В одном варианте осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_{16}углеводородную цепь (например, линейный C_{16}алкил или алкенил).

Липофильный фрагмент может быть присоединен к средству для RNAi любым способом, известным из уровня техники, в том числе посредством получения функциональной группы уже присутствующей в липофильном фрагменте или введенной в средство для RNAi, такой как гидроксильная группа (например, —CO—CH_2—OH). Функциональные группы, уже присутствующие в липофильном фрагменте или введенные в средство для RNAi, включают без ограничения гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

Конъюгация средства для RNAi и липофильного фрагмента может происходить, например, посредством образования простой эфирной или сложноэфирной связи с участием карбоновой кислоты или карбамоила между гидрокси- и алкильной группой R-, алканоильной группой RCO- или замещенной карбамоильной группой RNHCO-. Алкильная группа R может быть циклической (например, циклогексил) или ациклической (например, иметь прямую или разветвленную цепь; быть насыщенной или ненасыщенной). Алкильная группа R может представлять собой бутильную, пентильную, гексильную, гептильную, октильную, нонильную, децильную, ундецильную, додецильную, тридецильную, тетрадецильную, пентадецильную, гексадецильную, гептадецильную или октадецильную группу или т. п.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с двухнитевым средством для RNAi посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевину, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол, полученный путем азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

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

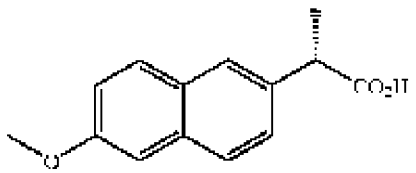
В другом варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой ароматический фрагмент. В этом контексте термин «ароматический» в широком смысле относится к моно- и полиароматическим углеводородам. Ароматические группы включают без ограничения C_6-C_{14}арильные фрагменты, содержащие от одного до трех ароматических колец, которые могут быть необязательно замещенными; «аралкильные» или «арилалкильные» группы, содержащие арильную группу, ковалентно связанную с алкильной группой, каждая из которых независимо может быть необязательно замещенной или незамещенной; и «гетероарильные» группы. Используемый в данном документе термин «гетероарил» относится к группам, имеющим 5-14 атомов в кольце, предпочтительно 5, 6, 9 или 10 атомов в кольце с 6, 10 или 14 π-электронами, обобществленными в циклической структуре, и содержащим, помимо атомов углерода, от одного до приблизительно трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота (N), кислорода (O) и серы (S).

Используемая в данном документе «замещенная» алкильная, циклоалкильная, арильная, гетероарильная или гетероциклическая группа представляет собой группу, имеющую от одного до приблизительно четырех, предпочтительно от одного до приблизительно трех, более предпочтительно один или два заместителя, отличных от водорода. Подходящие заместители включают без ограничения галоген, гидрокси, нитро, галогеналкил, алкил, алкарил, арил, аралкил, алкокси, арилокси, амино,

ациламино, алкилкарбамоил, арилкарбамоил, аминоалкил, алкоксикарбонил, карбокси, гидроксиалкил, алкансульфонил, аренсульфонил, алкансульфонамидо, аренсульфонамидо, аралкилсульфонамидо, алкилкарбонил, ацилокси, циано и уреидо группы.

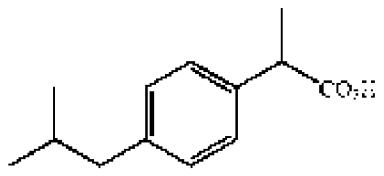
В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой аралкильную группу, например 2-арилпропаноильный фрагмент. Структурные особенности аралкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильный фрагмент связывался с по меньшей мере одним белком in vivo. В определенных вариантах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

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой напроксен или структурное производное напроксена. Методики синтеза напроксена можно найти в патенте США № 3904682 и патенте США № 4009197, которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Напроксен имеет химическое название (S)-6-метокси-α-метил-2-нафталинуксусная кислота, а его структура представляет собой



.

В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой ибупрофен или структурное производное ибупрофена. Методики синтеза ибупрофена можно найти в патенте США № 3228831, которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Структура ибупрофена представляет собой



.

Дополнительные иллюстративные аралкильные группы проиллюстрированы в патенте США № 7626014, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В другом варианте осуществления подходящие липофильные фрагменты включают липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-O-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексианол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, ибупрофен, напроксен, диметокситритил или феноксазин.

В определенных вариантах осуществления в двухнитевое средство для RNAi можно включить более одного липофильного фрагмента, в частности, если липофильный фрагмент характеризуется низкой липофильностью или гидрофобностью. В одном варианте осуществления два или более липофильных фрагмента включены в одну и ту же нить двухнитевого средства для RNAi. В одном варианте осуществления в каждую нить двухнитевого средства для RNAi включены один или более липофильных фрагментов. В одном варианте осуществления два или более липофильных фрагментов включены в одно и то же положение (т. е. находятся при одном и том же нуклеиновом основании, одном и том же сахарном фрагменте или одной и той же межнуклеозидной связи) двухнитевого средства для RNAi. Это может быть достигнуто, например, путем конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством носителя, и/или конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством разветвленного линкера, и/или конъюгирования двух или более липофильных фрагментов посредством одного или более линкеров, с помощью одного или более линкеров, последовательно связывающих липофильные фрагменты.

Липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством для RNAi посредством прямого присоединения к рибосахару средства для RNAi. В качестве альтернативы липофильный фрагмент может быть конъюгирован с двухнитевым средством для RNAi посредством линкера или носителя.

В определенных вариантах осуществления липофильный фрагмент может быть конъюгирован со средством для RNAi посредством одного или более линкеров (связывающих фрагментов).

В одном варианте осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с двухнитевым средством для RNAi посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевину, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол, полученный путем азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

Иллюстративные линкеры, связывающие фрагменты, носители, модификации нуклеиновых кислот, конъюгаты, лиганды и другие фрагменты, применимые для осуществления направленной на центральную нервную систему доставки нацеливающихся на APP средств для RNAi по настоящему изобретению описаны более подробно, например, в заявках на патент США №№ 62/668072, 62/738747 и/или 62/773082, полное содержание которых включено в данный документ посредством ссылки.

B. *Липидные конъюгаты*

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например, сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным сосудистое распределение конъюгата в целевой ткани, например, в целевой ткани организма, отличной от ткани почек. В определенных вариантах осуществления целевая ткань может представлять собой ЦНС, включая глиальные клетки головного мозга. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно применять непроксин или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (a) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, и/или (c) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для ингибирования, например, регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд

или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, с меньшей вероятностью будет нацеливаться в почку и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который менее прочно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата в почку.

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

В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почку. В дополнение к лиганду на основе липида или вместо него также можно использовать другие фрагменты, которые нацеливаются в клетки почки.

В другом аспекте лигандом представляет собой 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 витамин A, E и K. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы B, например, фолиевую кислоту, B12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины, или питательные элементы, поглощаемые целевыми клетками, например, клетками головного мозга. Также включены HAS и липопротеин низкой плотности (LDL).

C. *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 antennapedia. 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 фазы.

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 для RNAi может воздействовать на фармакокинетическое распределение средства для RNAi, например, путем повышения степени распознавания и всасывания 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 в основном 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 содержать гидрофобную последовательность, обеспечивающую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным пептидом, содержащим гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 29). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 30), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может быть «доставляющим пептидом», который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 31) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 32) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, указанный в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке «одна гранула-одно соединение» (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Примером

пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе dsRNA посредством введенной мономерной единицы для нацеливания на клетку, является пептид, состоящий из аргинина-глицина-аспарагиновой кислоты (RGD), или RGD-имитатор. 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, для облегчения нацеливания на специфическую(-ие) ткань(-и). Пептиды и пептидомиметики, содержащие RGD, могут иметь D-аминокислоты, а также синтетические RGD-имитаторы. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливают лиганд на интегрин. 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 α-спиральный линейный пептид (например, LL-37 или цекропин P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например, α-дефензин, β-дефензин или бактенецин) или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может содержать сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен за счет слияния пептидного домена gp41 HIV-1 и NLS крупного T-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

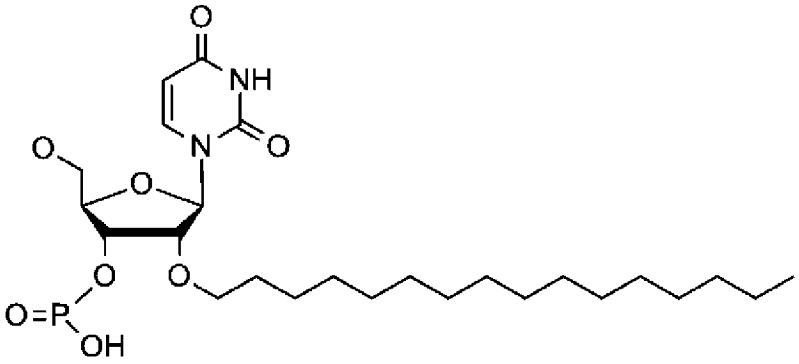
D. *Углеводные конъюгаты и лиганды*

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению олигонуклеотид средства для RNAi дополнительно содержит углевод. Средства для RNAi, конъюгированные с углеводом, предпочтительны для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, как описано в данном документе. Используемый в данном документе термин «углевод» относится к соединению, которое представляет собой либо углевод сам по себе, образованный из одной или более моносахаридных структурных единиц, содержащих 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 более моносахаридных структурных единиц, каждая из которых содержит 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 С5сахара и сахара с большим числом атомов (например, С5, С6, С7 или С8); ди- и трисахариды включают сахара, содержащие две или три моносахаридные структурные единицы (например, С5, С6, С7 или С8).

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

В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают С16-лиганд. В иллюстративных вариантах осуществления С16-лиганд по настоящему описанию характеризуется следующей структурой (в качестве примера ниже приведено присоединение к нуклеотиду с урациловым основанием, однако предполагается, что С16-лиганд присоединяется к нуклеотиду, содержащему любое основание (С, G, А и т. д.) и/или имеющему любую другую модификацию, представленную в данном документе, при условии, что сохраняется прикрепление в 2′-

положении рибозы) и прикреплен в 2′-положении рибозы в пределах остатка, который модифицирован таким образом:



Химическая формула: $C_{25}H_{43}N_2O_8P$

Точная масса: 530,2757

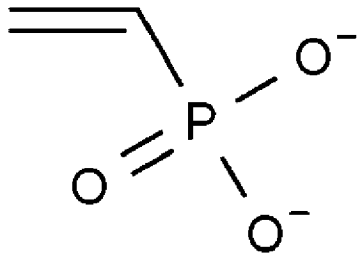
Молекулярная масса: 530,5913

Как показано выше, остаток, модифицированный C16-лигандом, содержит алкил с прямой цепью в 2′-положении рибозы иллюстративного остатка (в данном случае урацила), который модифицирован таким образом.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат средства для RNAi по настоящему изобретению дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как без ограничения PK-модулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

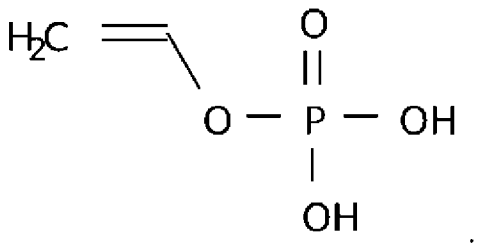
Дополнительные углеводные конъюгаты (и линкеры), подходящие для применения в настоящем изобретении, включают описанные в публикациях согласно PCT №№ WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают винилфосфонатную модификацию (VP) средства для RNAi, описанного в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему изобретению имеет следующую структуру:



Винилфосфонат по настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой нити dsRNA по настоящему изобретению. В определенных предпочтительных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему изобретению присоединен к антисмысловой нити средства dsRNA, необязательно на 5′-конце антисмысловой нити dsRNA.

Винилфосфатные модификации также предусмотрены для композиций и способов по настоящему изобретению. Иллюстративная структура винилфосфата представляет собой:



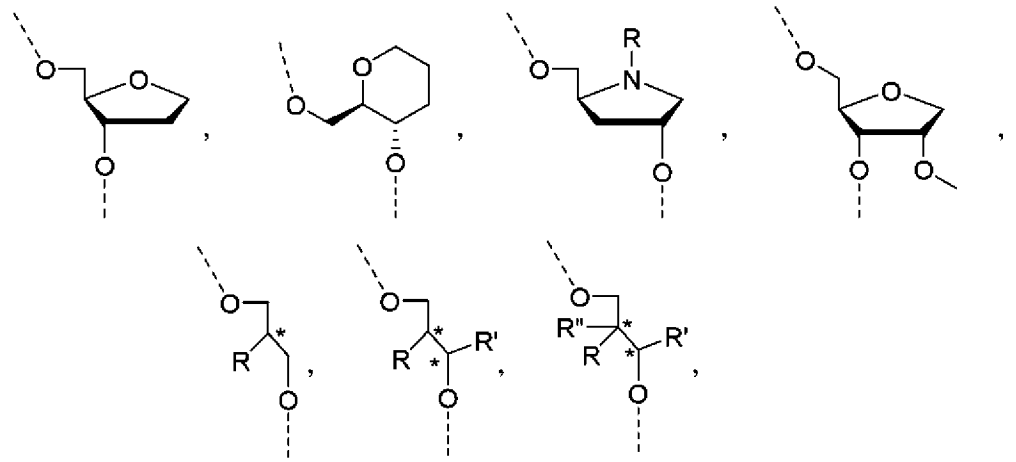
E. *Нарушающие термостабильность модификации*

В определенных вариантах осуществления молекула dsRNA может быть оптимизирована для РНК-интерференции путем введения нарушающих термостабильность модификаций в затравочный участок антисмысловой нити (т. е. в положения 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити) для уменьшения или ингибирования нецелевого сайленсинга генов. Было обнаружено, что молекулы dsRNA с антисмысловой нитью, содержащей по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5′-конца антисмысловой нити, обладают пониженной нецелевой активностью сайленсинга генов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) нарушающую термостабильность дуплекса

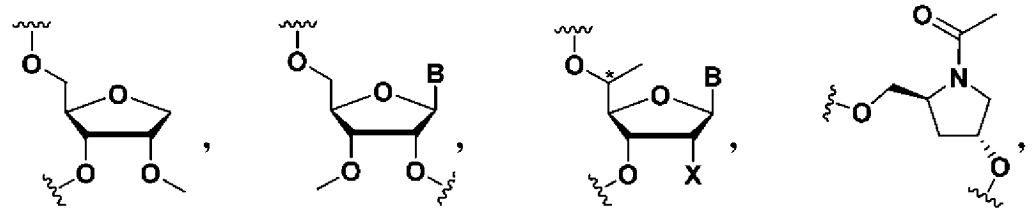
модификацию в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5′-участка антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления одна или более нарушающих термостабильность модификаций дуплекса находятся в положениях 2-9 или предпочтительно положениях 4-8 от 5′-конца антисмысловой нити. В некоторых дополнительных вариантах осуществления нарушающая(-ие) термостабильность модификация(-и) дуплекса находится(-ятся) в положении 6, 7 или 8 от 5′-конца антисмысловой нити. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация находится в положении 7 от 5′-конца антисмысловой нити. Термин «нарушающая(-ие) термостабильность модификация(-ии)» включает модификацию(-и), приводящую(-е) к образованию dsRNA с более низкой общей температурой плавления (Tm) (предпочтительно Tm на один, два, три или четыре градуса ниже, чем Tm dsRNA, не имеющей такой(-их) модификации(-ий)). В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация находится в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5′-конца антисмысловой нити.

Нарушающие термостабильность модификации могут включать без ограничения модификацию с удалением азотистого основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи и модификацию сахара, такую как 2′-дезокси-модификация или ациклический нуклеотид, например, незапертые нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA).

Иллюстративные модификации с удалением азотистого основания включают без ограничения следующее:



где R = H, Me, Et или OMe; R′ = H, Me, Et или OMe; R" = H, Me, Et или OMe,



Mod 2
(2′-OMe-спейсер с удаленным азотистым основанием)

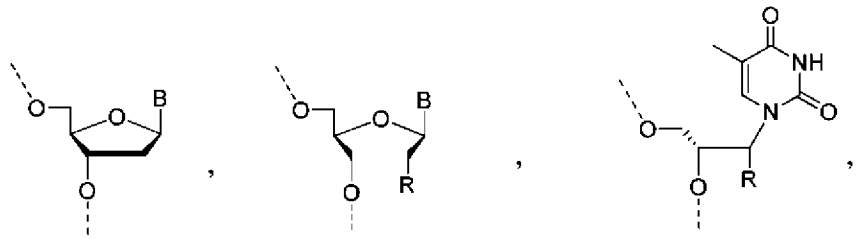
Mod3
(3'-OMe)

Mod4
(5'-Me)
X = OMe, F

Mod 5
(Нур-спейсер)

где B представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

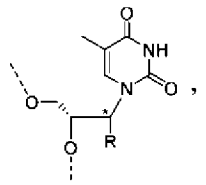
Иллюстративные модификации сахара включают без ограничения следующее:



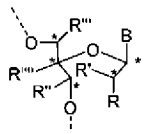
2′-дезокси

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

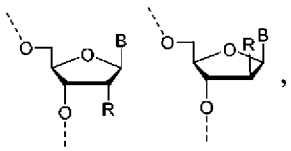
гликолевая нуклеиновая кислота
R= H, OH, O-алкил



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



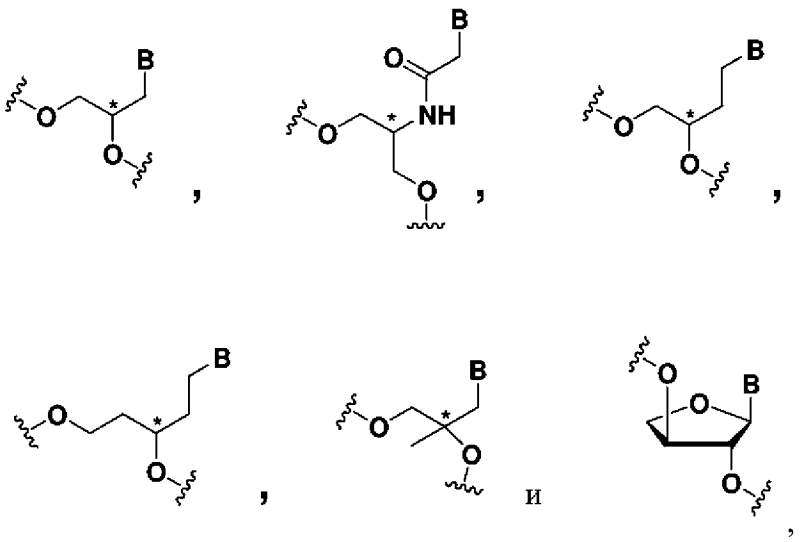
незапертая нуклеиновая кислота
R= H, OH, CH_3, CH_2CH_3, O-алкил, NH_2, NHMe, NMe_2
R'= H, OH, CH_3, CH_2CH_3, O-алкил, NH_2, NHMe, NMe_2
R"= H, OH, CH_3, CH_2CH_3, O-алкил, NH_2, NHMe, NMe_2
R'"= H, OH, CH_3, CH_2CH_3, O-алкил, NH_2, NHMe, NMe_2
R""= H, OH, CH_3, CH_2CH_3, O-алкил, NH_2, NHMe, NMe_2



R= H, метил, этил

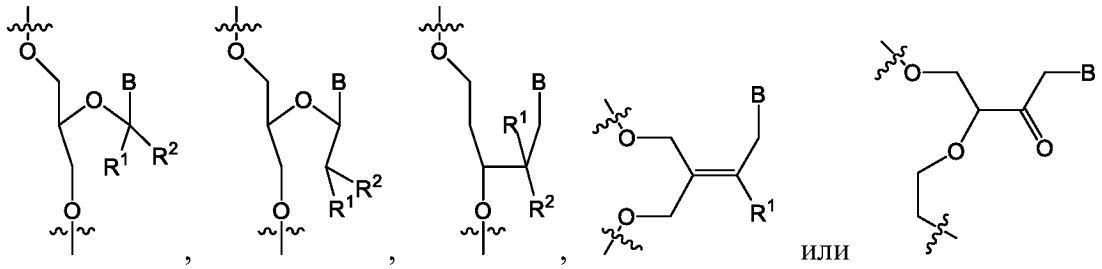
где B представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация выбрана из группы, состоящей из:



где B представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, а звездочка на каждой структуре представляет либо *R*, *S*, либо рацемический.

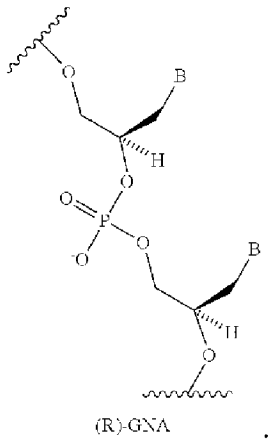
Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду с ациклическим рибозным сахаром, например, в котором любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1′-C2′, C2′-C3′, C3′-C4′, C4′-O4′ или C1′-O4′) отсутствует и/или в нуклеотиде отсутствует по меньшей мере один из атомов углерода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



где B представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Термин «UNA» относится к незапертой ациклической нуклеиновой кислоте, при этом какая-либо из связей в сахаре была удалена с образованием незапертого «сахарного» остатка. В одном примере UNA также охватывает мономеры, у которых удалены связи между C1′-C4′ (т. е. ковалентная углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1′ и C4′). В другом примере удалена связь C2′-C3′ (т. е. ковалентная углерод-

углеродная связь между атомами углерода C2′ и C3′) в сахаре (см. Mikhailov et. al., Tetrahedron Letters, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 10: 1039 (2009), которые настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не оказывая влияния на спаривание оснований по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством связи 2′-5′ или 3′-5′.

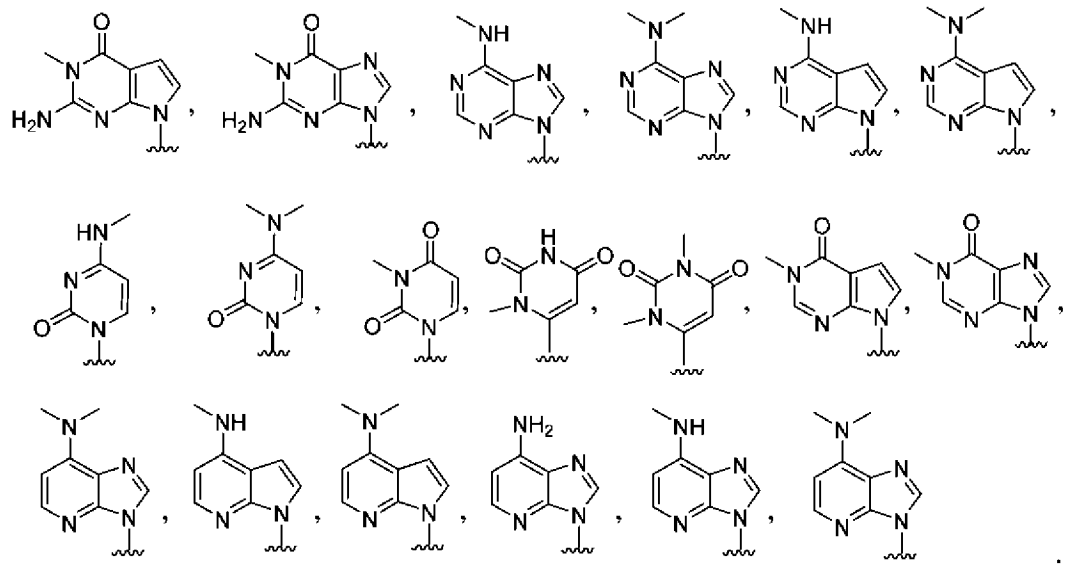
Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся от них составом своего «остова», поскольку его составляют повторяющиеся структурные единицы глицерина, соединенные фосфодиэфирными связями:



Нарушающая термостабильность дуплекса модификация может представлять собой ошибочные спаривания (т. е. некомплементарные пары оснований) между нарушающим термостабильность нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной нити dsRNA-дуплекса. Иллюстративные ошибочно спаренные пары оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинацию. Другие виды ошибочного спаривания оснований, известные из уровня техники, также применимы в настоящем изобретении. Ошибочное спаривание может происходить между нуклеотидами, которые представляют собой как встречающиеся в природе нуклеотиды, так и модифицированные нуклеотиды, т. е. ошибочное спаривание оснований может происходить между нуклеиновыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций, присутствующих в рибозных сахарах нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления молекула dsRNA содержит по меньшей мере одно нуклеиновое основание, принимающее участие

в ошибочном спаривании, т. е. 2′-дезоксирибонуклеиновое основание; например 2′-дезоксирибонуклеиновое основание в смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация в затравочном участке антисмысловой нити включает нуклеотиды с ослабленной способностью к образованию H-связей по W-C с комплементарным основанием целевой мРНК, такие как:

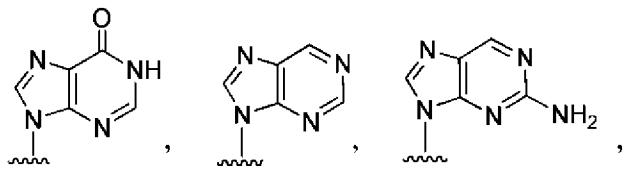


Больше примеров нуклеотидов с удаленным азотистым основанием, модификаций в виде ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций, представляющих собой ошибочное спаривание, подробно описано в WO 2011/133876, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

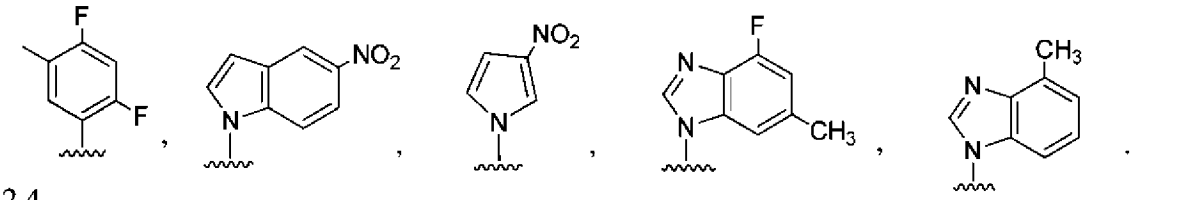
Нарушающие термостабильность модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями противоположной цепи, а также фосфатные модификации.

В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как без ограничения модификации нуклеиновых оснований с ослабленной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной нити. Такие модификации нуклеиновых оснований были исследованы в отношении нарушения стабильности центрального участка dsRNA-

дуплекса, как описано в WO 2010/0011895, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:

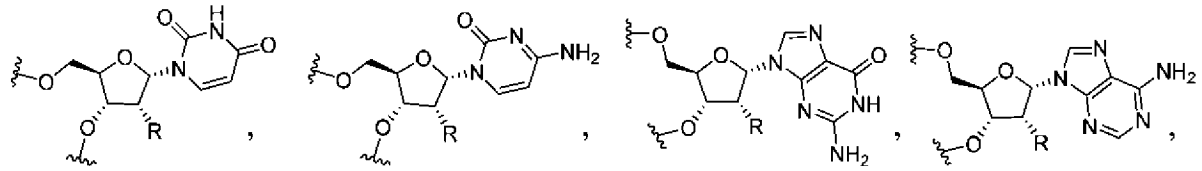


инозин небуларин 2-аминопурин



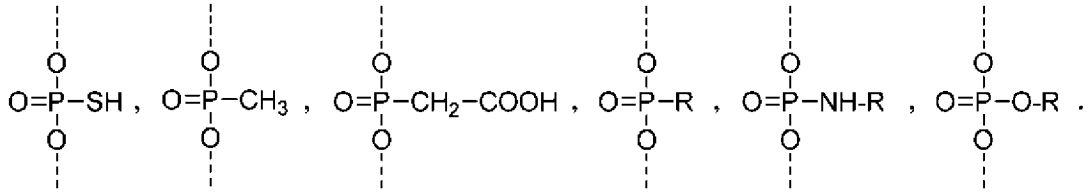
2,4-дифтортолуол 5-нитроиндол 3-нитропиррол 4-фтор-6-метилбензимидазол 4-метилбензимидазол

В некоторых вариантах осуществления нарушающая термостабильность дуплекса модификация в затравочном участке антисмысловой нити включает один или более α-нуклеотидов, комплементарных основанию в целевой мРНК, таких как:



где R представляет собой H, OH, OCH_3, F, NH_2, NHMe, NMe_2 или O-алкил.

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



R=алкил

Алкил, обозначенный как группа R, может представлять собой C_1-C_6алкил. Конкретные алкилы, обозначенные как группа R, включают без ограничения метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Как будет понятно специалисту в данной области техники, с учетом функциональной роли нуклеиновых оснований в определении специфичности средства для RNAi по настоящему изобретению, хотя модификации нуклеиновых оснований могут выполняться различными способами, описанными в данном документе, например, для введения нарушающих стабильность модификаций в средство для RNAi по настоящему изобретению, например, с целью усиления целевого эффекта относительно нецелевого эффекта, диапазон доступных модификаций и присутствующих на средствах для RNAi по настоящему изобретению, как правило, намного больше для модификаций, не связанных с нуклеиновыми основаниями, например , модификаций сахарных групп и/или фосфатных остовов полирибонуклеотидов. Такие модификации описаны более подробно в других разделах настоящего изобретения и явно предполагаются для средств для RNAi по настоящему изобретению, имеющих либо нативные нуклеиновые основания, либо модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше и/или в других разделах в данном документе.

В дополнение к антисмысловой нити, содержащей нарушающую термостабильность модификацию, dsRNA также может содержать одну или более стабилизирующих модификаций. Например, dsRNA может содержать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений все стабилизирующие модификации могут находиться в одной нити. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая нити содержат по меньшей мере две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может находиться на любом нуклеотиде смысловой нити или антисмысловой нити. Например, стабилизирующая модификация может находиться на каждом нуклеотиде в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая стабилизирующая модификация может располагаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или же смысловая нить или антисмысловая нить содержат обе стабилизирующие модификации в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой нити может быть таким же, как в антисмысловой нити, или

отличным от него, и чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна стабилизирующих модификаций в антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений стабилизирующая модификация в антисмысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5′-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5м-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 от 5м-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, которая расположена рядом с нарушающей стабильность модификацией. Например, стабилизирующая модификация может представлять собой нуклеотид на 5′-конце или 3′-конце нарушающей стабильность модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения нарушающей стабильность модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит нарушающую стабильность модификацию на каждом из 5′-конца и 3′-конца нарушающей стабильность модификации, т. е. в положениях -1 и +1 относительно положения нарушающей стабильность модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере две стабилизирующие модификации на 3′-конце нарушающей стабильность модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения нарушающей стабильность модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений стабилизирующая модификация в смысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в

положениях 7, 10 и 11 от 5′-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12 и 15 антисмысловой нити, считая от 5′-конца антисмысловой нити. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит стабилизирующие модификации в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой нити, считая от 5′-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить не содержит стабилизирующую модификацию в положении, являющемся противоположным или комплементарным нарушающей термостабильность дуплекса модификации в антисмысловой нити.

Иллюстративные повышающие термостабильность модификации включают без ограничения 2′-фтор-модификации. Другие повышающие термостабильность модификации включают без ограничения LNA.

В некоторых вариантах осуществления dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений все 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды могут находиться в одной нити. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая нити содержат по меньшей мере два 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. 2′-Фтор-модификация может находиться на любом нуклеотиде смысловой нити или антисмысловой нити. Например, 2′-фтор-модификация может находиться на каждом нуклеотиде в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая 2′-фтор-модификация может располагаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или же смысловая нить или антисмысловая нить содержит обе 2′-фтор-модификации в виде чередующегося паттерна. Чередующийся паттерн 2′-фтор-модификаций в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн 2′-фтор-модификаций в смысловой нити

может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна 2′-фтор-модификаций в антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений 2′-фтор-модификация в антисмысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5′-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5′-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 от 5′-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере один 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, который расположен рядом с нарушающей стабильность модификацией. Например, 2′-фтор-модифицированным нуклеотид может представлять собой нуклеотид на 5′-конце или 3′-конце нарушающей стабильность модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения нарушающей стабильность модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированный нуклеотид на каждом из 5′-конца и 3′-конца нарушающей стабильность модификации, т. е. в положениях -1 и +1 относительно положения нарушающей стабильность модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит по меньшей мере два 2′-фтор-модифицированных нуклеотида на 3′-конце нарушающей стабильность модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения нарушающей стабильность модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2′-фтор-модифицированных нуклеотида. Без ограничений 2′-фтор-модификация в смысловой нити может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды

в положениях 7, 10 и 11 от 5′-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12 и 15 антисмысловой нити, считая от 5′-конца антисмысловой нити. В некоторых других вариантах осуществления смысловая нить содержит 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды в положениях, являющихся противоположными или комплементарными положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой нити, считая от 5′-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит блок из двух, трех или четырех 2′-фтор-модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить не содержит 2′-фтор-модифицированный нуклеотид в положении, являющемся противоположным или комплементарным нарушающей термостабильность дуплекса модификации в антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую нить из 21 нуклеотида (нт) и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов (нт), где антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), при этом один конец dsRNA является тупым, в то время как другой конец содержит выступающий конец из 2 нт, и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит тупой конец на 5′-конце антисмысловой нити. Предпочтительно, выступающий конец из 2 нт находится на 3′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где длина смысловой нити составляет 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная от 5′-концевого нуклеотида (положение 1), в положениях 1-23 указанной смысловой нити содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой нити составляет 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная от 3′-концевого нуклеотида, она содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой нити с образованием дуплекса; при этом 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, за счет чего образуется однонитевой 3′-выступающий конец из 1-6 нуклеотидов; при этом 5′-конец антисмысловой нити содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой нитью, за счет чего образуется однонитевой 5′-выступающий конец из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5′-концевой и 3′-концевой нуклеотиды смысловой нити образуют пары оснований с нуклеотидами антисмысловой нити, если смысловая и антисмысловая нити выровнены с обеспечением максимальной комплементарности, за счет чего образуется практически полностью дуплексный участок между смысловой и антисмысловой нитями; и антисмысловая нить характеризуется достаточной степенью комплементарности с целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой нити, чтобы снизить экспрессию целевого гена при введении указанной двухнитевой нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, где по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити). Например, нарушающий термостабильность нуклеотид находится между положениями, являющимися противоположными или комплементарными положениям 14-17 от 5′-конца смысловой нити, и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-

модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-30 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую нити, где указанная молекула dsRNA содержит смысловую нить длиной по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов и антисмысловую нить длиной не более 30 нуклеотидов, при этом смысловая нить содержит модифицированный нуклеотид, который поддается ферментативному расщеплению, в положении 11 от 5′-конца, при этом 3′-конец указанной смысловой нити и 5′-конец указанной антисмысловой нити образуют тупой конец, и указанная антисмысловая нить на своем 3′-конце на 1-4 нуклеотида длиннее, чем смысловая нить, при этом длина дуплексного участка составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая нить характеризуется достаточной степенью комплементарности с целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нт по длине указанной антисмысловой нити, чтобы снизить экспрессию целевого гена при введении указанной молекулы dsRNA в клетку млекопитающего, и при этом расщепление указанной dsRNA под действием Dicer предпочтительно приводит к образованию siRNA, содержащей указанный 3′-конец указанной антисмысловой нити, за счет чего обеспечивается снижение экспрессии целевого гена у млекопитающего, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид, при этом по меньшей мере один нарушающий термостабильность нуклеотид находится в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; и (vii) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-29 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити молекулы dsRNA может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицированным с помощью одной и той же или отличной модификации, которая может включать одно или более изменений одного или обоих не образующих связь атомов кислорода в фосфате и/или одного или более образующих связь атомов кислорода в фосфате; изменение компонента рибозного сахара, например 2′-гидроксила на 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 находятся в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может находиться только в 3′- или 5′-концевом положении, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов нити. Модификация может находиться в двухнитевом участке, в однонитевом участке или в обоих. Модификация может находиться только в двухнитевом участке РНК или может находиться только в однонитевом участке РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении не образующего связь атома O может находиться только на одном или обоих концах, может находиться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов нити, или может находиться в двухнитевом и однонитевом участках, в частности, на концах. 5′-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступающие концы или для включения модифицированных нуклеотидов или заменителей нуклеотидов в однонитевые выступающие концы, например в 5′- или 3′-выступающий конец или в оба. Например, может потребоваться включить в выступающие концы пуриновые нуклеотиды. 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, 2′-дезокси-2′-фтор-(2′-F)- или 2′-O-метил-модифицированного вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификации в фосфатной группе, например, фосфотиоатные модификации. Выступающие концы необязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, 2′-метоксиэтила, 2′-O-метила, 2′-O-аллила, 2′-C-аллила, 2′-дезокси или 2′-фтора. Нити могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2′-O-метила или 2′-фтора. Следует понимать, что такие модификации введены в дополнение к по меньшей мере одной нарушающей термостабильность дуплекса модификации, присутствующей в антисмысловой нити.

Как правило, в смысловой нити и антисмысловой нити присутствуют по меньшей мере две различные модификации. Эти две модификации могут представлять собой 2′-дезокси-, 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой нити и антисмысловой нити содержит два нуклеотида с отличающимися модификациями, выбранными из 2′-O-метил- или 2′-дезокси-модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2′-O-метилнуклеотида, 2′-дезоксинуклеотида, 2′-дезокси-2′-фторнуклеотида, 2′-O-N-метилацетамидо (2′-O-NMA)-нуклеотида, 2′-O-диметиламиноэтоксиэтил (2′-O-DMAEOE)-нуклеотида, 2′-O-аминопропил (2′-O-AP)-нуклеотида или 2′-ара-F-нуклеотида. Опять же, следует понимать, что такие модификации введены в дополнение к по меньшей мере одной нарушающей термостабильность дуплекса модификации, присутствующей в антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит модификации в виде чередующегося паттерна, в частности, в участках B1,

B2, B3, B1′, B2′, B3′, B4′. Используемый в данном документе термин «чередующийся мотив» или «чередующийся паттерн» относится к мотиву, содержащему одну или более модификаций, при этом каждая модификация находится на чередующихся нуклеотидах одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из A, B и C представляет один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой «ABABABABABAB…», «AABBAABBAABB…», «AABAABAABAAB…», «AAABAAABAAAB…», «AAABBBAAABBB…» или «ABCABCABCABC…» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но для каждой из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана одна из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, как, например, «ABABAB…», «ACACAC…», «BDBDBD…» или «CDCDCD…» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления для молекулы dsRNA по настоящему изобретению предусмотрено, что паттерн модификаций в виде чередующегося мотива в смысловой нити сдвинут относительно паттерна модификаций в виде чередующегося мотива в антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует группе нуклеотидов с отличающимися модификациями в антисмысловой нити и наоборот. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в dsRNA-дуплекс чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с «ABABAB» в направлении 5′-3′-конца нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с «BABABA» в направлении 3′-5′-конца нити в пределах дуплексного участка. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с «AABBAABB» в направлении 5м-3′-конца нити, и чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с «BBAABBAA» в направлении 3′-5′-конца нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью существует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

Молекула dsRNA по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может находиться при любом нуклеотиде смысловой нити или антисмысловой нити или обеих в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может находиться при каждом нуклеотиде в смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может располагаться в виде чередующегося паттерна в смысловой нити или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить содержит 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 некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA содержит фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в участке выступающего конца. Например, участок выступающего конца содержит два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между этими двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения нуклеотидов выступающих концов с концевыми спаренными нуклеотидами 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 ближайшим к нуклеотиду выступающего конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами может присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются нуклеотидами выступающего конца, а третий представляет собой спаренный нуклеотид, ближайший к нуклеотиду выступающего конца. Предпочтительно эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить молекулы dsRNA содержит 1-10 блоков из от двух до десяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая нить спарена с антисмысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из трех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из четырех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14

фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из шести фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из семи фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с

антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из восьми фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить молекулы dsRNA содержит два блока из девяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая нить спарена со смысловой нитью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или с антисмысловой нитью, содержащей или фосфотиоатную, или метилфосфонатную, или фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или обоих концах смысловой и/или антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 остатков внутреннего участка дуплекса каждой из смысловой и/или антисмысловой нити. Например, по меньшей

мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть соединены посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8-16 дуплексного участка, считая от 5′-конца смысловой нити; при этом молекула dsRNA необязательно может дополнительно содержать одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные или метилфосфонатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в

пределах положений 1-5 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и 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).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 и одну в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 1-5 (считая от 5′-конца) смысловой нити и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 (считая от 5′-конца) смысловой нити и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и одну в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и 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).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 1-5 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в пределах положений 18-23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в пределах положений 18-23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 20 и 21 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную

модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5′-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 20 и 21 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 21 и 22 смысловой нити (считая от 5м-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5′-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 21 и 22 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 22 и 23 смысловой нити (считая от 5′-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой нити (считая от 5′-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидных связей в положениях 23 и 23 антисмысловой нити (считая от 5′-конца).

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит паттерн хиральных центров остова. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 6 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 7 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 8 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 9 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 16 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления

общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 17 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 18 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 19 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 8 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 7 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 6 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 5 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 4 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 3 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 2 межнуклеотидных связей в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 1 межнуклеотидной связи в Rp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными (в качестве неограничивающего примера фосфодиэфирных связей). В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 3 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 2

межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит не более 1 межнуклеотидной связи, которая не является хиральной. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий паттерн хиральных центров остова содержит по меньшей мере 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Rp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи, которые не являются хиральными, необязательно являются смежными или несмежными.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Rp-блок, в котором каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая межнуклеотидная

связь блока представляет собой Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат как Rp-, так и Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или более Rp-блоков, но не содержат Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или более Sp-блоков, но не содержат Rp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предусмотренные олигонуклеотиды содержат один или более PO-блоков, где каждая межнуклеотидная связь находится в виде природной фосфатной связи.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит 5′-блок, представляющий собой Sp-блок, при этом каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок представляет собой Sp-блок, при этом каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок представляет собой Sp-блок, при этом каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок содержит 4 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок содержит 5 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5м-блок содержит 6 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 5′-блок содержит 7 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок представляет собой Sp-блок, при этом каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок представляет собой Sp-блок, при этом каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок представляет собой Sp-блок, при этом каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2′-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок содержит 4 или более нуклеозидных структурных единиц. В

некоторых вариантах осуществления 3′-блок содержит 5 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок содержит 6 или более нуклеозидных структурных единиц. В некоторых вариантах осуществления 3′-блок содержит 7 или более нуклеозидных структурных единиц.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению в участке или олигонуклеотиде содержит определенный тип нуклеозида, за которым следует специфический тип межнуклеотидной связи, например природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, хиральная межнуклеотидная Rp-связь, хиральная межнуклеотидная Sp-связь и т. д. В некоторых вариантах осуществления за A следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за A следует Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления за A следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за U следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за U следует Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления за U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за C следует Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления за C следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за G следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за G следует Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления за G следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Rp-связь. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за A и G следует Sp-связь. В некоторых вариантах осуществления за A и G следует Rp-связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, при этом антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию, расположенную в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 3, 4 или 5

фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию, расположенную в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерны по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-40 пар нуклеотидов; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию, расположенную в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv)

смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (v) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; (vii) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) dsRNA имеет тупой конец на 5′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая нить содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию, расположенную в затравочном участке антисмысловой нити (т. е. в положении 2-9 от 5′-конца антисмысловой нити), и при этом для dsRNA необязательно дополнительно характерна по меньшей мере одна (например, одна, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих особенностей: (i) антисмысловая нить содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2′-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая нить содержит 2, 3, 4 или 5 2′-фтор-модификаций; (iv) смысловая нить содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) dsRNA содержит по меньшей мере четыре 2′-фтор-модификации; (vi) dsRNA содержит дуплексный участок длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (vii) dsRNA имеет тупой конец на 5′-конце антисмысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит ошибочное(-ые) спаривание(-ия) с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может находиться в участке выступающего конца или дуплексном участке. Пары оснований можно ранжировать на основании их свойства 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). Ошибочные спаривания, например, неканонические или отличные от канонических

спаривания (описанные в других разделах данного документа), предпочтительнее канонических спариваний (A:T, A:U, G:C); а спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических спариваний.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований от 5′-конца в пределах дуплексных участков антисмысловой нити, которая независимо может быть выбрана из группы, состоящей из: A:U, G:U, I:C и пар с ошибочными спариваниями, например, с неканоническими или отличными от канонического спариваниями или спариваниями, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5′-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 от 5′-конца в пределах дуплексного участка антисмысловой нити выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований 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.

Было обнаружено, что введение 4′-модифицированного и/или 5′-модифицированного нуклеотида в 3′-конец фосфодиэфирной (PO), фосфотиоатной (PS) и/или фосфодитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении однонитевого или двухнитевого олигонуклеотида может оказывать стерический эффект в отношении межнуклеотидной связи и, следовательно, защитить ее от действия нуклеаз или стабилизировать ее.

В некоторых вариантах осуществления 5′-модифицированный нуклеозид вводят в 3′-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Например, 5′-алкилированный нуклеозид может быть введен в 3′-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в 5′-положении рибозного сахара может определять принадлежность к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру или их рацемической смеси. Иллюстративный 5′-алкилированный нуклеозид представляет собой 5′-метилнуклеозид. 5′-метил может определять

принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси.

В некоторых вариантах осуществления 4′-модифицированный нуклеозид вводят в 3′-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Например, 4′-алкилированный нуклеозид может быть введен в 3′-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. Алкильная группа в 4′-положении рибозного сахара может определять принадлежность к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру или их рацемической смеси. Иллюстративный 4′-алкилированный нуклеозид представляет собой 4′-метилнуклеозид. 4′-метил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси. В качестве альтернативы 4′-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен в 3′-конец динуклеотида в любом положении однонитевой или двухнитевой siRNA. 4′-*O*-алкил рибозного сахара может определять принадлежность к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру или их рацемической смеси. Иллюстративный 4′-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4′-*O*-метилнуклеозид. 4′-*O*-метил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси.

В некоторых вариантах осуществления 5′-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация поддерживает или увеличивает эффективность dsRNA. 5′-Алкил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси. Иллюстративный 5′-алкилированный нуклеозид представляет собой 5′-метилнуклеозид. 5′-метил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси.

В некоторых вариантах осуществления 4′-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация поддерживает или увеличивает эффективность dsRNA. 4′-Алкил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси. Иллюстративный 4′-алкилированный нуклеозид представляет собой 4′-метилнуклеозид. 4′-метил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси.

В некоторых вариантах осуществления 4′-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение в смысловой нити или антисмысловой нити dsRNA, и такая модификация поддерживает или увеличивает эффективность dsRNA. 5′-Алкил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси. Иллюстративный 4′-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4′-*O*-метилнуклеозид. 4′-*O*-метил может определять принадлежность либо к хирально чистому *R*- или *S*-изомеру, либо к их рацемической смеси.

В некоторых вариантах осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может содержать 2′-5′ связи (при этом содержит 2′-H, 2′-OH и 2′-OMe, а также с P=O или P=S). Например, модификации 2′-5′-связей можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой с антисмысловой нитью, или их можно использовать на 5′-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой нити под действием RISC.

В другом варианте осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2′-H, 2′-OH и 2′-OMe). Например, такие L-модификации сахаров можно использовать для содействия устойчивости к нуклеазам или для подавления связывания смысловой с антисмысловой нитью, или их можно использовать на 5′-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой нити под действием RISC.

В различных публикациях описаны мультимерные siRNA, все из которых можно применять с dsRNA по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые настоящим включены во всей своей полноте.

Если молекула dsRNA содержит один или более углеводных фрагментов, конъюгированных с молекулой dsRNA, одно или более свойств молекулы dsRNA могут быть оптимизированы. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице молекулы dsRNA. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц молекулы dsRNA может быть заменен другим фрагментом, например неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную

субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более 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 более 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 атому циклического носителя, входящему в состав кольца, например, атому углерода или гетероатому (отличному 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 и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. 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.

В одном варианте осуществления молекула dsRNA по настоящему изобретению конъюгирована 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 серинолового остова или диэтаноламинового остова.

Средство на основе двухнитевой РНК (dsRNA) по настоящему изобретению необязательно может быть конъюгировано с одним или более лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или обеим нитям на 3′-конце, 5′-конце или обоих концах. Например, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью, в частности с 3′-концом смысловой нити.

В некоторых вариантах осуществления молекулы dsRNA по настоящему изобретению являются 5′-фосфорилированными или включают аналог фосфорила на 5′(штрих)-конце. 5′-Фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5′-монофосфат ($(HO)_2$(O)P-O-5′); 5′-дифосфат ($(HO)_2$(O)P-O-P(HO)(O)-O-5′); 5′-трифосфат ($(HO)_2$(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5′); 5′-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный) (7m-G-O-5′-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5′); 5′-аденозиновый кэп (Appp) и любую модифицированную или немодифицированную кэп-структуру нуклеотида (N-O-5′-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5′); 5′-монотиофосфат (фосфотиоат; $(HO)_2$(S)P-O-5′); 5′-монодитиофосфат (фосфодитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5′), 5′-фосфотиолат ((HO)2(O)P-S-5′); любую дополнительную комбинацию кислород/сера-замещенных монофосфата, дифосфата и трифосфатов (например 5′-альфа-тиотрифосфат, 5′-гамма-тиотрифосфат и т. д.), 5′-фосфорамидаты ($(HO)_2$(O)P-NH-5′, (HO)(NH_2)(O)P-O-5′), 5′-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т. д., например RP(OH)(O)-O-5′-, 5′-алкенилфосфонаты (т. е. винил, замещенный винил), $(OH)_2$(O)P-5′-CH2-), 5′-алкилэфирфосфонаты (R=алкиловый эфир=метоксиметил (MeOCH2-), этоксиметил и т. д., например RP(OH)(O)-O-5′-). В одном примере модификацию можно поместить в антисмысловую нить молекулы dsRNA.

F. *Линкеры*

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду средства для RNAi 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 непосредственную связь или атом, такой как кислород или сера, структурную единицу, такую как NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH, 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 котором один или более метиленов могут прерываться или оканчиваться O, S, S(O), SO_2, N(R8), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенным или незамещенным гетероциклил; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатическую группу или замещенную алифатическую группу. 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 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая является в достаточной степени стабильной вне клетки, но которая при поступлении в целевую

клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется в 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 приблизительно 100 раз быстрее в целевой клетке или при первом эталонном условии (например, которое может быть выбрано для имитации или моделирования внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором эталонном условии (например, которое может быть выбрано для имитации или моделирования условий, свойственных крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к факторам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Факторы расщепления ы целом более распространены 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 выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать линкерную группу, расщепляемую в ходе окислительно-восстановительных реакций, 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 при предпочтительном pH, за счет 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, на которую происходит нацеливание.

Как правило, пригодность расщепляемой линкерной группы-кандидата можно оценить с помощью тестирования способности разрушающего средства (или условия) расщеплять эту линкерную группу-кандидата. Кроме того, желательно также тестировать расщепляемую линкерную группу-кандидата в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбрано для иллюстрации расщепления в целевой клетке, а второе выбрано для иллюстрации расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови. Измерения можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или на животных в целом. Может быть полезно выполнить первичные оценки в условиях бесклеточной системы или культуры и подтвердить дальнейшими оценками на животных в целом. В предпочтительных вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты расщепляются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i. Линкерные группы, расщепляемые в ходе окислительно-восстановительных реакций

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой линкерную группу, расщепляемую в ходе окислительно-восстановительных реакций, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей «расщепляемой при восстановлении линкерной группой» или, например, подходящей для применения с конкретным фрагментом iRNA и конкретным нацеливающим средством, можно обратиться к способам, описанным в данном документе. Например, кандидата можно оценить при инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстанавливающим средством с применением реагентов, известных

в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая наблюдалась бы в клетке, например, в целевой клетке. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий в крови или сыворотке крови. В одном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются на не более чем приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты разрушаются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 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 соединений-кандидатов 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 другом варианте 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-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Этих кандидатов можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы

В другом варианте 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 с pH, составляющим приблизительно 6,5 или меньше (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или меньше), или под действием средств, таких как ферменты, которые могут действовать как универсальная кислота. 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. Этих кандидатов можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

iv. Сложноэфирные линкерные группы

В другом варианте 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 сложные эфиры с алкиленовыми, алкениленовыми и алкиниленовыми группами. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы характеризуются общей формулой -C(O)O- или -OC(O)-. Этих кандидатов можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

v. Пептидные расщепляемые группы

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер предусматривает пептидную расщепляемую 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 получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Пептидные расщепляемые группы не

включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована с участием любого алкилена, алкенилена или алкинилена. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Пептидная расщепляемая группа обычно ограничивается пептидной связью (т. е. амидной связью), образуемой между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу в общем смысле. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида характеризуются общей формулой - NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Этих кандидатов можно оценивать с помощью способов, аналогичных описанным выше.

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

Необязательно, чтобы все положения в указанном соединении были модифицированы одинаковым образом, и, на самом деле, более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах средства для RNAi. Настоящее изобретение также включает средства для RNAi, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» средства для RNAi или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой средства для RNAi, предпочтительно dsRNA, 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 dsRNA. Такие средства для RNAi, как правило, содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы обеспечить средству для RNAi повышенную устойчивость к разрушению нуклеазами, повышенный захват

клеткой и/или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительный участок средства для RNAi может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКаза Н представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет нить РНК в дуплексе РНК:ДНК. Активация РНКазы Н, следовательно, приводит к расщеплению РНК-мишени, за счет чего значительно повышается эффективность ингибирования экспрессии гена, опосредованного средством для RNAi. Следовательно, зачастую при применении химерных dsRNA сравнимые результаты можно получить с более короткими средствами для RNAi по сравнению с фосфотиоатными дезокси-dsRNA, 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 в данной области техники.

В определенных случаях РНК средства для RNAi может быть модифицирована с помощью группы, не являющейся лигандом. Целый ряд молекул, не являющихся лигандами, были конъюгированы со средствами для RNAi для увеличения активности, распределения в клетках или захвата средства для RNAi клеткой, и процедуры для выполнения таких типов конъюгации доступны в научной литературе. В такие фрагменты, не являющиеся лигандами, были включены 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), простой тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Let., 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 триэтил-аммония 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), полиамин или полиэтиленгликольная 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 октадециламин, или гексиламино-карбонил-

оксихолестериновый 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 включают синтез молекул РНК, несущих линкер с аминогруппой в одном или более положениях последовательности. Затем осуществляют реакцию аминогруппы с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего связующего или активирующего реагентов. Реакцию конъюгации можно выполнять, когда РНК все еще связана с твердой подложкой, или после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

VI. Доставка средства для RNAi по настоящему изобретению

Доставку средства для RNAi по настоящему изобретению к клетке например, клетке в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с ассоциированным с APP нарушением, например, CAA и/или AD, например, EOFAD), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей средство для RNAi, например dsRNA. В качестве альтернативы доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют средство для RNAi и управляют его 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 со средством для RNAi 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 во всей свой полноте). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитываются в контексте доставки средства для RNAi, включают, например, биологическую стабильность доставляемого средства, предупреждения неспецифических эффектов и накопление доставляемого средства в целевой ткани. Неспецифические эффекты средства для RNAi могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань, или местного применения

препарата. Локальное введение в точку приложения лечения максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу средства для RNAi. С помощью нескольких исследований было показано эффективный нокдаун продуктов гена при локальном введении средства для RNAi. Например, было показано, что как внутриглазная доставка dsRNA против VEGF путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ. *et al.*, (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретинальные инъекции мышам (Reich, SJ. *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предупреждали неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает объем опухоли (Pille, J., *et al.* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать выживание мышей, несущих опухоли (Kim, WJ. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. *et al.*, (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Также было показано, что РНК-интерференция была 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 a.l* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al.* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya,Y., *et al.* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) и в легкие путем интраназального введения (Howard, KA. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. *et al.*, (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). В случае системного введения средства для RNAi для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или в качестве альтернативы доставлена с помощью системы доставки лекарственного средства; при этом действие обоих способов направлено на предупреждение быстрого разрушение dsRNA под действием эндо- и экзонуклеаз *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание средства для RNAi на целевую ткань и избежать нежелательных нецелевых эффектов (например, без привязки к какой-либо теории было обнаружено, что применение GNA, описанной в данном документе, нарушает стабильность затравочного участка dsRNA, что приводит к преимущественному повышению целевой эффективности относительно нецелевых эффектов у таких dsRNA, поскольку такие нецелевые эффекты значительно ослаблены за счет такого нарушения стабильности затравочного участка). Для усиления захвата клеткой и предупреждения разрушения средства для RNAi можно модифицировать путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин.

Например, направленное против ApoB средство для RNAi, конъюгированное с липофильным холестериновым фрагментом, инъецировали системно мышам, что приводило к нокдауну мРНК apoB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгирование средства для RNAi с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в мышиной модели рака предстательной железы (McNamara, JO. *et al.*, (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления средство для RNAi можно доставлять с помощью систем для доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулярного средства для RNAi (отрицательно заряженного) и также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного захвата средства для RNAi клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны со средством для RNAi, либо в результате индуцирования образовывать пузырек или мицеллу (см., например, Kim SH. *et al.*, (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себе средство для RNAi. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает разрушение средства для RNAi при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионный липид-средство для RNAi вполне 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. Cancer 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 доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки средств для RNAi, включают DOTAP (Sorensen, DR., et al (2003), выше; Verma, UN. *et al.*, (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann, TS. *et al.,* (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY. *et al.*, (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. *et al.*, (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. *et al.*, (2008) *Pharm. Res.* предварительная электронная публикация 16 августа; 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 средство для RNAi образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы

введения и фармацевтические композиции на основе средств для RNAi и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу снижения экспрессии целевого гена APP в клетке, включающему приведение указанной клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку, не являющуюся клеткой печени, необязательно клетку ЦНС.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии целевого гена APP у субъекта, включающему введение субъекту двухнитевого средства для RNAi по настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, у которого имеется нарушение ЦНС, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого нацеливающегося на APP средства для RNAi по настоящему изобретению, за счет чего осуществляется лечение субъекта. Иллюстративные нарушения ЦНС, которые можно лечить с помощью способа по настоящему изобретению, включают болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS), лобно-височную деменцию, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, спиноцеребеллярные поражения, прионные болезни и болезнь Лафора.

В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi вводят интратекальным путем. За счет интратекального введения двухнитевого средства для RNAi с помощью данного способа можно обеспечить снижение экспрессии целевого гена APP в ткани головного мозга или спинного мозга, например, в коре, мозжечке, полосатом теле, шейном отделе спинного мозга, поясничном отделе спинного мозга и грудном отделе спинного мозга.

Для простоты изложения составы, композиции и способы в данном разделе главным образом обсуждаются в отношении соединений модифицированной siRNA. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно реализовывать на практике с другими соединениями siRNA, например соединениями немодифицированной siRNA, и такая практика не выходит за объем настоящего изобретения. Композиция, которая содержит средство для RNAi, может быть

доставлена субъекту с помощью разных путей. Иллюстративные пути включают интратекальный, внутривенный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, интраназальный, легочный, глазной.

Средства для RNAi по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Как правило, такие композиции содержат одну или более разновидностей средства для RNAi и фармацевтически приемлемый носитель. Предусматривается, что используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает всевозможные растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, средства для придания изотоничности и средства, задерживающие всасывание, и т. п., совместимые с применением в фармацевтических препаратах. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда какая-либо традиционная среда или средство не совместимы с активным соединением, предполагается их применение в композициях. В композиции также можно включать дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, требуется ли локальное или системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (в том числе глазным, вагинальным, ректальным, интраназальным, трансдермальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное введение, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или интратекальное или интравентрикулярное введение.

Путь и место введения можно выбирать для усиления нацеливания. Например, для нацеливания на мышечные клетки разумным выбором была бы внутримышечная инъекция в представляющие интерес мышцы. Нацеливание на клетки легких можно осуществлять путем введения средства для RNAi в форме аэрозоля. Нацеливание на клетки эндотелия сосудов можно осуществлять путем покрытия баллонного катетера средством для RNAi и механического введения ДНК.

Составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки.

Необходимыми или желательными могут быть традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. д. Также можно использовать презервативы, перчатки с покрытием и т. п.

Композиции для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде, сиропы, эликсиры или неводные среды, таблетки, капсулы, таблетки для рассасывания или пастилки. В случае таблеток носители, которые можно использовать, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках как правило используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсул подходящими разбавителями являются лактоза и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Если для перорального применения требуются водные суспензии, композиции на основе нуклеиновых кислот можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими средствами. При желании могут быть добавлены определенные подсластители и/или ароматизаторы.

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

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Интравентрикулярную инъекцию может облегчить интравентрикулярный катетер, например, прикрепленный к резервуару. В случае внутривенного применении общую концентрацию растворенных веществ можно контролировать для обеспечения изотоничности препарата.

В одном варианте осуществления введение композиции на основе соединения siRNA, например, соединения двухнитевой siRNA или соединения ssiRNA, проводят с помощью парентерального, например, внутривенного (например, в виде болюса или диффундирующей инфузии), внутрикожного, внутрибрюшинного, внутримышечного, интратекального, интравентрикулярного, интракраниального, подкожного, чресслизистого, трансбуккального, сублингвального, эндоскопического, ректального, перорального, вагинального, местного, легочного, интраназального, уретрального или глазного путей. Введение может осуществлять субъект или другое лицо, например

медицинский работник. Лекарственный препарат может обеспечиваться в виде отмеренных доз или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные режимы доставки более подробно обсуждаются ниже.

Интратекальное введение. В одном варианте осуществления двухнитевое средство для RNAi доставляют посредством интратекальной инъекции (т. е. инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Интратекальная инъекция средств для RNAi в спинномозговую жидкость может выполняться в виде болюсной инъекции или с помощью мини-насосов, которые могут быть имплантированы под кожу, с обеспечением регулярной и постоянной доставки siRNA в спинномозговую жидкость. Циркуляция спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения желудочков мозга, где она вырабатывается, вниз по всему спинному мозгу и ганглиям задних корешков, а затем вверх за пределами мозжечка и через кору к грануляциям паутинной оболочки, где жидкость может покинуть ЦНС, приводит к тому, что в зависимости от размера, стабильности и растворимости введенных соединений молекулы, доставленные интратекально, могут достигать своих целей на протяжении всей ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляют посредством насоса. Насос может представлять собой осмотический насос, имплантированный хирургическим путем. В одном варианте осуществления осмотический насос имплантирован в субарахноидальное пространство позвоночного канала для облегчения интратекального введения.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляется через систему интратекальной доставки фармацевтического препарата, включающую резервуар, содержащий некоторый объем фармацевтического средства, и насос, выполненный с возможностью доставки порции фармацевтического средства, содержащегося в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе интратекальной доставки можно найти в PCT/US2015/013253, поданной 28 января 2015 г., которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

Количество вводимых интратекально средств для RNAi может варьироваться в зависимости от целевого гена, и подходящее количество, которое следует применять, может определяться индивидуально для каждого целевого гена. Как правило это

количество находится в диапазоне от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

А. Кодируемые вектором средства для RNAi по настоящему изобретению

Средства для RNAi, нацеливающиеся на APP, могут экспрессироваться со структурных единиц транскрипции, встроенных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, международную публикацию согласно PCT № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно PCT № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от нескольких часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или больше) в зависимости от специфической применяемой конструкции и целевых ткани или типа клеток. Эти трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующийся или неинтегрирующийся вектор. Трансген также может быть сконструирован с обеспечением возможности его наследования в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1292).

Отдельные нить или нити средства для RNAi могут транскрибироваться с промотора в векторе экспрессии. Если следует экспрессировать две отдельные нити для получения, например dsRNA, в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В качестве альтернативы каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться за счет промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, за счет чего dsRNA имеет структуру типа «стебель-петля».

Векторы экспрессии средства для RNAi обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Чтобы получать рекомбинантные конструкции для экспрессии средства для RNAi, описанного в данном документе, можно использовать векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и доступны из целого ряда

коммерческих источников. Как правило, предусматривается, что такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих средство для RNAi, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или с помощью любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в требуемую целевую клетку.

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, включая без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышиного 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 ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипоксвируса, например, поксвируса канареек или 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 средства для RNAi в целевых клетках в конструкциях для рекомбинантной экспрессии средства для RNAi обычно будет требоваться наличие регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т. д. В данной области техники известны другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций.

VII. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые содержат средства для RNAi по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие средство для RNAi, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие средство для

RNAi, применимы для лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией или активностью гена APP, например, ассоциированного с APP заболевания, например CAA или AD, например EOFAD.

Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV), внутримышечной (IM) или подкожной (subQ) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в ЦНС, например, с помощью путей, предусматривающих интратекальную или интравитреальную инъекцию, необязательно с помощью инфузии в головной мозг, такой как непрерывная инфузия с помощью насоса.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена APP. В целом, подходящая доза средства для RNAi 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 средства для RNAi 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 дозы может включать введение терапевтического количества средства для RNAi на регулярной основе, как, например, от двух раз в месяц или одного раза в месяц до одного раза в год. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в квартал (т. е. приблизительно один раз в три месяца).

По завершению начальной схемы лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой.

Единица дозирования может быть составлена для доставки в течение длительного периода, например, с использованием традиционного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение средства для RNAi в течение длительного периода. Составы с замедленным высвобождением

хорошо известны в данной области техники и особенно применимы для доставки средств в конкретное место, например, их можно применять со средствами по настоящему изобретению. В данном варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное количество, например, месячную дозу.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может характеризоваться длительным действием, так что последующие дозы вводят не ранее, чем через 1, 2, 3 или 4 или больше недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций по настоящему изобретению вводят два раза в месяц.

Специалисту в данной области технике будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, требуемые для эффективного лечения субъекта, включая без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может предусматривать один период лечения или серию периодов лечения. Расчеты эффективных доз и периодов полужизни *in vivo* для отдельных средств для RNAi, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методов или на основе тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели, описанной в другом разделе данного документа.

Достижения в области генетики мышей позволили получить целый ряд мышиных моделей для изучения различных заболеваний человека, таких как ассоциированные с APP нарушения, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP. Такие модели можно применять для проведения тестирования средств для RNAi *in vivo*, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышиные модели известны в данной области техники и включают, например, модели AD и/или CAA, описанные в другом разделе данного документа.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, требуется ли локальное или системное

лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например, посредством имплантированного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, интратекальное или интравентрикулярное введение.

Средства для RNAi можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань, такую как ЦНС (например, нейрональную, глиальную и/или сосудистую ткань головного мозга).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т. п. Также можно использовать презервативы, перчатки с покрытием и т. п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых средства для RNAi, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин, DOPE, димиристоилфосфатидилхолин, DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин, DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил, DOTAP, и диолеоилфосфатидилэтаноламин, DOTMA). Средства для RNAi, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы средства для RNAi могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую

кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложный C_{1-20}алкиловый эфир (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ посредством ссылки.

A. Составы на основе средства для RNAi, содержащие мембранные молекулярные ансамбли

Средство для RNAi для применения в композициях и способах по настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например, в липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например, одного бислоя или нескольких бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию на основе средства для RNAi. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию на основе средства для RNAi, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы применимы для переноса и доставки активных ингредиентов к месту их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при введении липосом в ткань бислой липосомы сливается с бислоем клеточных мембран. По мере того как происходит слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает средство для RNAi, доставляется в клетку, где средство для RNAi может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления средства для RNAi в конкретные типы клеток.

Липосому, содержащую средство для RNAi, можно получить с помощью множества способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте таким образом, что из липидного компонента образуются мицеллы. Например,

липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионогенным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем к мицеллам, которые включают липидный компонент, добавляют препарат на основе средства для RNAi. Катионные группы на липиде взаимодействуют со средством для RNAi и конденсируются вокруг средства для RNAi с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, с помощью диализа, с получением липосомного препарата на основе средства для RNAi.

При необходимости в ходе реакции конденсации можно добавлять соединение-носитель, которое содействует конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). Для содействия конденсации также можно корректировать pH.

Способы получения стабильных средств для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов средств для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Образование липосом может также включать один или более аспектов иллюстративных способов, описанных в Felgner, P. L. *et al.,* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham *et al.,* (1965) *M. Mol. Biol.* 23:238; Olson *et al.*, (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557:9; Szoka *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194; Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169; Kim *et al.*, (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 728:339; и Fukunaga *et al.*, (1984) *Endocrinol.* 115:757. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов соответствующего размера для использования в качестве средств для доставки, включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer *et al.,* (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858:161. Микрофлюидизацию можно применять в тех случаях, когда требуются стабильно малые (50-200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew *et al.,* (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169. Такие способы легко адаптировать для упаковки препаратов на основе средства для RNAi в липосомы.

Липосомы делятся на два больших класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс нуклеиновая кислота/липосома связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие кислого pH внутри эндосомы, липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в клеточную цитоплазму (Wang *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют комплекс с ними. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид заряжены одинаковым образом, вместо образования комплекса происходит отталкивание. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновых кислот захватывается в водную внутреннюю среду этих липосом. Чувствительные к pH липосомы были использованы для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. В целевых клетках выявляли экспрессию экзогенного гена (Zhou *et al.* (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Композиции для нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции для анионных липосом обычно образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

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

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их применимости в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионогенные липосомные системы были эффективны в содействии отложению циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu *et al*., (1994) *S.T.P.Pharma. Sci.*, 4(6):466).

Липосомы также включают «пространственно стабилизированные» липосомы, причем используемый в данном документе термин относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к продлению времени пребывания в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть образующей везикулу липидной составляющей липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1}, или (В) получена из одного или более гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Без привязки к какой-либо конкретной теории в данной области техники предполагают, что по меньшей мере в случае пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-дериватизированные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженной степени захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen *et al*., (1987) *FEBS Letters,* 223:42; Wu *et al*., (1993) *Cancer Research*, 53:3765).

Из уровня техники известны различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов. Papahadjopoulos *et al*. (*Ann. N.Y. Acad. Sci*., (1987), 507: 64) сообщили о способности моносиалоганглиозида G_{M1}, сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти результаты подробно изложили Gabizon *et al*. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* (1988), 85,:6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen *et al*., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сложный

эфир сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb *et al.*) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim *et al*).

В одном варианте осуществления применяют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не могут настолько же эффективно сливаться с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами in vivo, и их можно использовать для доставки средств для RNAi в макрофаги.

Дополнительный преимущества липосом включают следующие: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биодеградируемыми; липосомы могут вмещать широкий диапазон водо- и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные средства для RNAi в своих внутренних компартментах от метаболизма и разрушения (Rosoff в «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

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

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеоилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом для получения везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд, США) представляет собой эффективное средство для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое предусматривает положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно

взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов также является положительным, если используют достаточное количество липосом с положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана, США), отличается от DOTMA тем, что олеоиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие описанные соединения катионного липида включают соединения, которые были конъюгированы с различными фрагментами, включая, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин, США) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермиламид («DPPES») (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат катионного липида предусматривает дериватизацию липида с помощью холестерина («DC-Chol»), при этом он был составлен в виде липосом в комбинации с DOPE (см. Gao, X. and Huang, L., (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8). Считается, что у определенных линий клеток такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем композиции, содержащие DOTMA. Другие коммерчески доступные продукты, содержащие катионные липиды, включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния, США) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд, США). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы особенно подходят для местного введения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные эффекты, связанные с высоким системным всасыванием введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в требуемой мишени и возможность введения средства для RNAi в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы применяют для доставки средства для RNAi в клетки эпидермиса, а также для улучшения проникновения средства для RNAi в дермальные ткани, например в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Была документально зафиксирована местная доставка в кожу лекарственных средств, составленных в виде липосом (см., например, Weiner *et al.*, (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2,405-410, и du Plessis *et al.*, (1992) *Antiviral Research*, 18:259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) *Biotechniques* 6:682-690; Itani, T. *et al.*, (1987) *Gene* 56:267-276; Nicolau, C. *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 149:157-176; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855).

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их применимости в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Для доставки лекарственного средства в дерму кожи мышей использовали неионогенные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир). Такие составы, содержащие средство для RNAi, применимы для лечения дерматологического нарушения.

Липосомам, которые включают средства для RNAi, можно придавать способность к сильной деформации. Такая способность к деформации может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. Например, одним типом липосом, способных к деформации, являются трансферосомы. Трансферосомы можно получать путем добавления активаторов поверхностной границы, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы, которые включают средство для RNAi, можно доставлять, например,

подкожно путем инъекции для доставки средства для RNAi к кератиноцитам в коже. Для того, чтобы пройти сквозь неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливаться к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с порядковыми №№ 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В заявке согласно PCT с № PCT/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

Трансферосомы представляют собой еще один тип липосом и являются липидными агрегатами со способностью к сильной деформации, которые являются перспективными кандидатами в качестве средств для доставки лекарственных средств Трансферосомы могут быть описаны как липидные капли, которые обладают способностью r настолько сильной деформации, что они легко могут проникать через поры, которые меньше мелкой капли. Трансферосомы могут приспосабливаться к окружающей среде, в которой они используются, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливаются к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, зачастую достигают своих мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферосом можно добавлять активаторы поверхностных границы, обычно поверхностно-активные вещества, в стандартную липосомную композицию. Трансферосомы применялись для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферосомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как составы, описанные в данном документе, в частности, в эмульсиях (в том числе микроэмульсиях) и липосомах. Наиболее распространенным способом

классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Для наиболее эффективного распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах, используется природа гидрофильной группы (также известной как «головка») (Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизируется, его классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их применяют в широком диапазоне значений pH. Обычно значения HLB таких веществ находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицериловые эфиры, сложные полиглицериловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-сополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как омыляющие вещества, ациллактилаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты, и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество

классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее используемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести и положительный, и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламиды, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Для применения в способах по настоящему изобретению средство для RNAi может также обеспечиваться в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы расположены в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекул направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Противоположное расположение наблюдается, если окружающая среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции на основе siRNA, C_8-C_{22}алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкильные эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять

одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл меньшего размера требуется интенсивное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию на основе siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции на основе siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений при интенсивном перемешивании.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т. е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного распыляемого раствора.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Специфические концентрации необходимых ингредиентов могут быть определены путем проведения относительно простых экспериментов. Для всасывания через ротовую полость часто требуется увеличить, например по меньшей мере удвоить или утроить, дозу для применения посредством инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

Липидные частицы

Средства для RNAi, например dsRNA, по настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например, в LNP или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемый в данном документе термин «LNP» относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. Как правило, LNP содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP исключительно применимы в случае системных путей введения, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных местах (например, местах, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, изложенный в публикации согласно PCT № WO 00/03683. Как правило, средний диаметр частиц по настоящему изобретению составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и они являются практически нетоксичными. Кроме того, если нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид по настоящему изобретению, то в водном растворе они устойчивы к разрушению под действием нуклеазы. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации заявки на патент США № 2010/0324120 и публикации согласно PCT № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (массовое соотношение) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до

приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В данной области техники были описаны определенные составы специфических LNP для доставки средств для RNAi, включая, например, составы «LNP01», описанные, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая настоящим включена посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липида-dsRNA определены в таблице ниже.

	Ионизируемый/катионный липид	**Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид** **Соотношение липид:siRNA**
SNALP-1	l,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) Липид:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 Липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 Липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 Липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1

LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-Диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-Гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1′-(2-(4-(2-((2-(Бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:siRNA 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:siRNA 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 Липид:siRNA 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:siRNA 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000)

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000)

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000)

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая настоящим включена посредством ссылки.

Составы, содержащие XTC, описаны в публикации согласно PCT № WO 2010/088537, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой настоящим включено посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны в публикации согласно PCT № WO 2010/054406, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в публикации согласно PCT № WO 2010/129709, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики-саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательны загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются составами, в которых

dsRNA, представленные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или более веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными вещества и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихенодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например, жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновая кислота и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, представленные в настоящем изобретении, можно доставлять перорально, в форме гранул, включая высушенные распылением частицы, или в составе комплексов для образования микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-дериватизированные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-

гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы на основе dsRNA для перорального введения и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, в публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутрипеченочного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как без ограничения вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из различных компонентов, которые включают без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. При лечении ассоциированных с APP заболеваний и нарушений особенно предпочтительными являются составы, которые нацеливаются на головной мозг.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые в целях удобства могут быть представлены в виде единичной лекарственной формы, можно получать в соответствии со стандартными методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим(-ими) носителем(-ями) или вспомогательным(-ыми) веществом(-ами). Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем при необходимости придания продукту формы.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как без ограничения таблетки,

капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции по настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

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 капель, 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, в 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 в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). 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»). Если водная фаза является тонкоизмельченной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в ней в виде мельчайших капель, полученную композицию называют эмульсией по типу «вода в масле» («w/o»). В качестве альтернативы, если масляная фаза является тонкоизмельченной в общем объеме водной фазы и диспергированной в ней в виде мельчайших капель, 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 в виде раствора в водной фазе, масляной фазе либо само по себе в качестве отдельной фазы. При необходимости в

эмульсиях также могут присутствовать фармацевтические вспомогательные вещества, 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 зачастую обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капли эмульсии по типу «o/w» заключают маленькие водные капли, составляют эмульсию по типу «w/o/w». Аналогичным образом, система масляных капель, 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. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае подобных эмульсии мазевых основ и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть разделены на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбирующие основы и тонкодисперные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные средства, нашли широкое применение в составе эмульсий, и они 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 он является ценным инструментом для классификации и 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, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий по типу «w/o», сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию. Тонкоизмельченные твердые вещества также применялись в качестве подходящих эмульгаторов, в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или тристеарат глицерина.

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, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагинан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант),

производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования прочных межфазных пленок вокруг капель диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии зачастую содержат целый ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые благоприятны для поддержания роста микроорганизмов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры п-гидроксибензойной кислоты и борную кислоту. Для предупреждения ухудшения качества состава в эмульсионные составы также обычно добавляют антиоксиданты. Используемые антиоксиданты могут быть акцепторами свободных радикалов, как например: токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, а также синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения 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; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки используются очень широко из-за легкости составления, а также с позиции эффективности при всасывании и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms и Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и

питательные препараты с высоким содержанием жира находятся в числе материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу «o/w».

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции на основе средств для RNAi и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система из воды, масла и амфифильного вещества, которая является единым оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии 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, с получением прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии из двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизированы за счет межфазных пленок поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия эмульсией по типу «вода в масле» («w/o») или по типу «масло в воде» («o/w»), зависит от свойств используемых масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott

Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Преимущество микроэмульсий по сравнению с традиционными эмульсиями состоит в солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе из термодинамически стабильных капель, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицеринмонолаурат (ML310), тетраглицеринмоноолеат (MO310), гексаглицеринмоноолеат (PO310), гексаглицеринпентаолеат (PO500), декаглицеринмонокапрат (MCA750), декаглицеринмоноолеат (MO750), декаглицеринсеквиолеат (SO750), декаглицериндекаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести за счет проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и вследствие этого создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и из уровня техники известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать без ограничения такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12)моно-, ди- и триглицериды, сложные полиоксиэтилированные эфиры жирных кислот и глицерина, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C8-C10глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенного всасывания лекарственных средств. Липидные

микроэмульсии (как по типу «o/w», так и по типу «w/o») были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения всасывания лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембран, легкости получения, легкости перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенной клинической эффективности и пониженной токсичности (см., например, патент США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Зачастую микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть особенно полезным при составлении термолабильных лекарственных средств, пептидов или средств для RNAi. Микроэмульсии также были эффективными в трансдермальной доставке активных компонентов в случаях применения как в косметологии, так и в фармации. Ожидается, что композиции и составы микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышению системного всасывания средств для RNAi и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальный захват средств для RNAi и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), лабразол и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения всасывания средств для RNAi и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, применяемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, не являющиеся поверхностно-активными (Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

iii. Микрочастицы

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

iv. Вещества, способствующие проникновению

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности средств для RNAi, в кожу животных используют разнообразные вещества, способствующие проникновению. 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 веществом, способствующим проникновению. В дополнение к содействию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатриующие 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 вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан более подробно ниже.

Поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные средства») являются химическими частицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается всасывание средств для

RNAi через слизистую оболочку. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам данные вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92) и эмульсии перфторированных соединений, такие как FC-43. Takahashi *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые действуют в качестве веществ, способствующих проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их сложные C_{1-20}алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т. е. олеат, лаурат, капрат, миристат, пальмитат, стеарат, линолеат и т. д.) (см., например, Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие диспергированию и всасыванию липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, термин «соли желчных кислот» включает любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую

кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидро-фузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, применяемые в сочетании с настоящим изобретением, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, что приводит к повышению всасывания средств для RNAi через слизистую оболочку. Что касается применения хелатирующих средств в настоящем изобретении в качестве веществ, способствующих проникновению, их дополнительное преимущество состоит том, что они также служат ингибиторами ДНКаз, поскольку для осуществления катализа большинству описанных ДНК-нуклеаз требуется двухвалентный ион металла, и вследствие этого они ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают в себя без ограничения этилендиаминтетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат, 5-метоксисалицилат и гомовалинат натрия), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

Используемые в данном документе нехелатирующие соединения, способствующие проникновению, которые не являются поверхностно-активными, можно определить как соединения, которые демонстрируют незначительную активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые,

тем не менее, усиливают всасывание средств для RNAi через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканоновые производные (Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают захват средств для RNAi на клеточном уровне, также можно добавлять в фармацевтические и другие композиции по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo *et al.*, заявка согласно PCT WO 97/30731), также, как известно, повышают захват dsRNA клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции среди прочего включают, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния, США), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомальной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Fugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин, США), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин, США), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин, США), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин, США), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass[a] D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего,

Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции BaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны, и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Носители

В состав некоторых композиций по настоящему изобретению также входят соединения-носители. Используемые в данном документе «соединение-носитель» или «носитель» может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т. е. сами по себе не обладают биологической активностью), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты происходящими *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, с избытком последнего вещества, может приводить к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, извлекаемой в печени, почках или других внесосудистых депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, извлечение dsRNA с ограниченным числом фосфотиоатных связей печеночной тканью может быть снижено при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4′-изотиоциано-стильбен-2,2′-дисульфокислотой (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

vi. Вспомогательные вещества

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «вспомогательное вещество» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или более нуклеиновых кислот в организм животного. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения так, чтобы обеспечить необходимый общий объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т. д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т. д).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, в таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно применять фармацевтически приемлемые органические или

неорганические вспомогательные вещества, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают без ограничения воду, растворы солей, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

vii. Другие компоненты

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие добавочные 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 при физическом составлении 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 излишне препятствовать проявлению биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно подвергать стерилизации и, при необходимости, смешиванию со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/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 и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, включают (a) одно или более средств для

RNAi и (b) одно или более средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые применимы в лечении ассоциированного с APP нарушения. Примеры таких средств включают без ограничения противовоспалительное средство, средство против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза, или другое средство, включенное для лечения AD (включая EOFAD) и/или CAA у субъекта.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на экспериментальных животных, например, для определения LD_{50} (дозы, летальной для 50% популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной у 50% популяции). Соотношение доз, обуславливающих токсический и терапевтический эффекты, представляет собой терапевтический индекс и его можно выразить как соотношение LD_{50}/ED_{50}. 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, подходящих для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, представленных в данном документе, обычно находится в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают ED_{50} при малой токсичности или без нее. Доза может варьироваться в пределах данного диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов на культурах клеток. Дозу можно определять на животных моделях с получением диапазона циркулирующих концентраций в плазме крови для соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения уменьшенной концентрации полипептида), который включает IC_{50} (т. е. концентрацию тестируемого соединения, при которой достигается полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную 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 обсуждаемому выше введению средства для RNAi, представленные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией APP. В любом случае врач, осуществляющий введение, может корректировать количество и временные рамки введения средства для RNAi, исходя из результатов, наблюдаемых при применении стандартных показателей эффективности, известных в данной области техники или описанных в данном документе.

VIII. Наборы

В определенных аспектах настоящего изобретения представлены наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав на основе соединения siRNA, например соединения двухнитевой siRNA или соединения ssiRNA (например, предшественник, например более крупное соединение siRNA, которое может быть преобразовано в соединение ssiRNA, или ДНК, которая кодирует соединение siRNA, например соединение двухнитевой siRNA или соединение ssiRNA или его предшественник). В определенных вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтического состава могут обеспечиваться в одном контейнере. В качестве альтернативы может потребоваться обеспечение компонентов фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата на основе соединения siRNA и по меньшей мере другой контейнер для соединения-носителя. Упаковка набора может иметь множество различных конфигураций, например, один или более контейнеров содержатся в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии с описанным в данном документе способом, например, для получения и введения фармацевтической композиции. В набор также может входить устройство для доставки.

IX. Способы ингибирования экспрессии APP

В настоящем изобретении также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена APP в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии APP в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование

экспрессии APP в клетке. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения APP преимущественно ингибируется в клетках ЦНС (например, головного мозга).

Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi, например, двухнитевым средством для RNAi, можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. 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, включая любой лиганд, описанный в данном документе или известный из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, C16-лиганд или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi в представляющее интерес место.

Используемый в данном документе термин «ингибирование» используется взаимозаменяемо со «снижением», «сайленсингом», «подавлением», «супрессией» и другими подобными терминами, и предусматривает любой уровень ингибирования. В определенных вариантах осуществления уровень ингибирования, например, у средства для RNAi по настоящему изобретению, может быть оценен в условиях культуры клеток, например, при осуществлении трансфекции клеток в культуре клеток посредством трансфекции, опосредованной Lipofectamine™, при концентрации вблизи клетки, составляющей 10 нМ или меньше, 1 нМ или меньше и т. д. Нокдаун под действием данного средства для RNAi может быть определен путем сравнения уровней в культуре клеток перед обработкой с уровнями в культуре клеток после обработки, необязательно также сравнения с клетками, обработанными параллельно с помощью рандомизированного средства или другой контрольной формы средства для RNAi. Таким образом, нокдаун в культуре клеток, например, составляющий по меньшей мере 10% или больше, по меньшей мере 20% или больше и т. д., можно считать показателем произошедшего «ингибирования» и/или «снижения», «подавления» или «супрессии» и т. д. Явно предполагается, что оценка уровней целевой мРНК и/или кодируемого белка

(и, следовательно, степени «ингибирования» и т. д., обусловленной средством для RNAi по настоящему изобретению) также может выполняться в системах *in vivo*, подходящих для средств для RNAi по настоящему изобретению, при надлежащим образом контролируемых условиях, описанных в данной области техники.

Используемая в данном документе фраза «ингибирование экспрессии APP» включает ингибирование экспрессии любого гена APP (такого как, например, ген APP мыши, ген APP крысы, ген APP обезьяны или ген APP человека), а также вариантов или мутантных форм гена APP, который кодирует белок APP. Таким образом, ген APP может представлять собой ген APP дикого типа, мутантный ген APP или трансгенный ген APP в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

«Ингибирование экспрессии гена APP» включает любой уровень ингибирования гена APP, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена APP, как, например, ингибирование на по меньшей мере приблизительно 20%. В определенных вариантах осуществления ингибирование происходит на по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

Экспрессию гена APP можно оценивать на основе уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена APP, например, уровня мРНК APP или уровня белка APP (включая продукты расщепления APP). Экспрессию APP также можно оценивать опосредованно на основе уровней ассоциированных с APP биомаркеров, описанных в данном документе.

Ингибирование можно оценивать по уменьшению абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который 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 определенных вариантах осуществления для обнаружения ингибирования APP можно применять суррогатные маркеры. Например, продемонстрированное с помощью приемлемых критериев диагностики и мониторинга эффективное предупреждение или лечение ассоциированного с APP нарушения, например, нарушения ЦНС, такого как EOFAD, CAA или другое нарушение, с помощью средства для снижения экспрессии APP, может пониматься как демонстрация клинически значимого снижения APP.

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена APP ингибируется на по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% или ниже уровня выявления в анализе. В определенных вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии APP, например, продемонстрированное с помощью клинически значимого результата после лечения субъекта с помощью средства для снижения экспрессии APP.

Ингибирование экспрессии гена APP 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 APP и которую или которых подвергали обработке (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, в организме которого присутствуют или присутствовали клетки), за счет чего экспрессия APP ингибируется, 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), которую(-ых) не обрабатывали с помощью средства для RNAi или не обрабатывали с

помощью средства для RNAi, нацеливающегося на представляющий интерес ген). Степень ингибирования можно выразить в виде:

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

В других вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена APP можно оценивать в контексте снижения параметра, который функционально связан с экспрессией гена APP, например, экспрессией белка APP, образованием и/или уровнями продуктов расщепления APP или путями передачи сигнала с участием APP. Сайленсинг гена APP можно определять в любой клетке, экспрессирующей APP либо эндогенно, либо гетерологично с экспрессионной конструкции, и с помощью любого анализа, известного в данной области техники.

Ингибирования экспрессии белка APP может проявляться как снижение уровня белка APP, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанных клетке или группе клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которые можно применять для оценки ингибирования экспрессии гена APP, включают клетку или группу клеток, которые еще не были приведены в контакт со средством для RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед проведения лечения субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК APP, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, может быть определен с помощью любого способа оценки экспрессии мРНК, известного в данной области техники. В одном варианте осуществления уровень экспрессии APP в образце определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например мРНК гена APP. РНК можно экстрагировать из клеток с помощью методик экстрагирования РНК, включая, например, экстрагирование 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* и микроматричные анализы. Циркулирующую мРНК APP можно выявить с помощью способов, описанных в публикации согласно PCT № WO2012/177906, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии APP определяют с помощью зонда на основе нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин «зонд» относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретным APP. 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 APP. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем разделения 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 от Affymetrix. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для применения в определении уровня мРНК APP.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии APP в образце предусматривает способ на основе амплификации и/или обратной транскрипции нуклеиновой кислоты (с получением кДНК), например, из мРНК в образце, например с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987,

патент США № 4683202), 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), транскрипционно-опосредованной системы амплификации (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликации по типу «катящегося кольца» (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любого другого способа на основе амплификации нуклеиновой кислоты с последующим выявлением амплифицированных молекул с помощью 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 APP определяют с помощью количественной флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TaqMan™), с помощью люциферазного анализа Dual-Glo® или другого признанного в данной области техники способа измерения экспрессии APP и/или уровня мРНК.

Уровни экспрессии мРНК APP можно отслеживать с использованием мембранного блота (такого как используется в гибридизационном анализе, таком как нозерн-, Саузерн-, дот-блоттинг-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 APP также может предусматривать использование зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Применение такого способа ПЦР описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе. Такие способы также можно применять для выявления нуклеиновых кислот APP, нуклеиновых кислот SREBP или нуклеиновых кислот PNPLA3.

Уровень экспрессии белка APP можно определить с применением любого способа измерения уровней белка, известного в данной области 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. Такие анализы также можно применять для выявления белков, являющихся показателем присутствия или репликации белков APP, продуктов расщепления APP или других белков, ассоциированных с APP, например, PSEN1, PSEN2 и т. д.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению в лечении связанного с APP заболевания оценивается по снижению уровня мРНК APP (например, при оценке образца CSF в отношении уровней Aβ, при биопсии головного мозга или иным образом).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту, за счет чего средство для RNAi доставляется в специфическое место в организме субъекта. Ингибирование экспрессии APP можно оценивать с помощью измерений уровня или изменения уровня мРНК APP или белка APP в образце, полученном из специфического места в организме субъекта, например, клеток ЦНС. В определенных вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии APP, например, продемонстрированное с помощью клинически значимого результата после лечения субъекта с помощью средства для снижения экспрессии APP.

Используемые в данном документе термины «выявление» или «определение» уровня аналита 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 аналита, который ниже уровня выявления для используемого способа.

X. Способы лечения или предупреждения ассоциированных с APP заболеваний

В настоящем изобретении также предусмотрены способы применения средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, для снижения и/или ингибирования экспрессии APP в

клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с dsRNA по настоящему изобретению и поддержание жизнедеятельности клетки в течение времени, достаточного для осуществления разрушения мРНК-транскрипта гена APP, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии гена APP в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники. Например, снижение экспрессии APP можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК APP с помощью способов, обычных для среднего специалиста в данной области техники, например, нозерн-блоттинга, qRT-PCR; путем определения уровня белка APP с помощью способов, обычных для среднего специалиста в данной области техники, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики. Снижение экспрессии APP также можно оценить опосредованно путем измерения снижения уровней растворимого продукта расщепления APP, например, снижения уровня растворимого α, APPβ и/или растворимого пептида Aβ, необязательно в образце CSF субъекта.

В способах по настоящему изобретению клетку можно приводить в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с помощью способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген APP. Клетка, подходящая для применения в способах по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка отличного от человека примата, например, клетку обезьяны или клетку шимпанзе), клетку отличного от примата животного (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку ЦНС человека.

Экспрессия APP в клетке ингибируется на по меньшей мере приблизительно 5, 6, 7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,

85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или приблизительно 100%. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия APP ингибируется на по меньшей мере 20%.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей средство для RNAi, где средство для RNAi содержит нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере части РНК-транскрипта гена APP млекопитающего, подлежащего лечению. Если организм, который подлежит лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек, то композицию можно вводить любым способом, известным в данной области техники, в том числе без ограничения с помощью перорального, внутрибрюшинного или парентерального путей, в том числе с помощью интракраниального (например, интравентрикулярного, интрапаренхиматозного и интратекального), внутривенного, внутримышечного, интравитреального, подкожного, трансдермального, воздушного (аэрозольного), назального, ректального и местного (в том числе буккального и сублингвального) введения. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. При инъекции депо-препарата средство для RNAi может высвобождаться постоянно в течение длительного периода времени. Таким образом, путем инъекции депо-препарата можно снизить частоту введения доз, необходимых для получения требуемого эффекта, например, требуемого ингибирования экспрессии APP или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата также может обеспечивать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или насосом, имплантируемым хирургическим путем. В определенных вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантируемый осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно применять для

внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой насос для подкожных инфузий. В других вариантах осуществления насос представляет собой насос, имплантируемый хирургическим путем, который доставляет средство для RNAi в ЦНС.

Способ введения можно выбрать, исходя из того, требуется ли местное или системное лечение, и исходя из области, подлежащей лечению. Путь и место введения можно выбирать для усиления нацеливания.

В одном аспекте настоящего изобретения также предусмотрены способы ингибирования экспрессии гена APP у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей dsRNA, которая нацеливается на ген APP в клетке млекопитающего, и поддержание жизнедеятельности млекопитающего в течение времени, достаточного для осуществления разрушения мРНК-транскрипта гена APP, за счет чего обеспечивается ингибирование экспрессии гена APP 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. Снижение продуцирования белка можно оценивать с помощью любых способов, известных в данной области техники, и с помощью способов, например ELISA, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления биоптат ЦНС или образец спинномозговой жидкости (CSF) служит в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка APP (или их заменителя, описанного в данном документе или известного в данной области техники).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения по настоящему изобретению включают введение средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, например субъекту, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии APP, в терапевтически эффективном количестве средства для RNAi, нацеливающегося на ген APP, или фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi, нацеливающееся на ген APP.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы снижения уровней Aβ40 и/или Aβ42 у субъекта. Способы включают введение средства для RNAi по настоящему изобретению субъекту, например субъекту, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии APP, в терапевтически эффективном количестве средства для RNAi, нацеливающегося на ген APP, или фармацевтической композиции, содержащей средство для RNAi, нацеливающееся на ген APP.

Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены способы предупреждения, лечения и/или приостановки прогрессирования ассоциированного с APP заболевания или нарушения (например, CAA и/или AD, необязательно EOFAD) у субъекта, как, например, прогрессирования ассоциированного с APP заболевания или нарушения до нейродегенерации, повышенного образования амилоидных бляшек и/или снижения когнитивных функций у субъекта, имеющего ассоциированное с APP заболевание или нарушение, или у субъекта с риском развития ассоциированного с APP заболевания или нарушения. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из dsRNA или фармацевтической композиции, предусмотренных в данном документе, за счет чего осуществляется предупреждение, лечение и/или приостановка прогрессирования ассоциированного с APP заболевания или нарушения у субъекта.

Средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в виде «свободного средства для RNAi». Свободное средство для RNAi вводят при отсутствии фармацевтической композиции. «Голое» средство для RNAi может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего средство для RNAi, можно корректировать так, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав с dsRNA.

Субъекты, на которых будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена APP, являются субъектами, имеющими

ассоциированное с APP нарушение. Термин «ассоциированное с APP заболевание» включает заболевание, нарушение или состояние, на которые будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии, репликации гена APP или активности белка. Неограничивающие примеры ассоциированных с APP заболеваний включают, например, CAA (включая hCAA и спорадическую CAA) и AD (включая EOFAD, спорадическую AD и/или AD с поздним началом, необязательно с CAA).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы применения средства для RNAi или фармацевтической композиции на его основе, например, для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии APP, например субъекта, имеющего ассоциированное с APP нарушение, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими способами терапии, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными способами терапии, такими как, например, используемые в настоящее время для лечения таких нарушений. Например, в определенных вариантах осуществления средство для RNAi, нацеливающееся на APP, например, вводят в комбинации со средством, применимым для лечения ассоциированного с APP нарушения, как описано в других разделах данного документе или как иным образом известно из уровня техники. Например, дополнительные средства, подходящие для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP, например субъекта, имеющего ассоциированное с APP нарушение, могут включать средства, применяемые в настоящее время для лечения симптомов AD. Неограничивающие примеры таких средств могут включать ингибиторы холинэстеразы (такие как донепезил, ривастигмат и галантамин), мемантин, BACE1i, средства иммунотерапии и ингибиторы секретазы. Средство для RNAi и дополнительные терапевтические средства можно вводить в одно и то же время и/или в одной и той же комбинации, например, интратекально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разные моменты времени, и/или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, представленной в данном документе, таким образом, чтобы экспрессия целевого гена APP уменьшалась, как, например, на приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24

часа, 28, 32 или приблизительно 36 часов. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена APP уменьшается на длительный срок, например, по меньшей мере на приблизительно два, три, четыре дня или больше, например, на приблизительно одну неделю, две недели, три недели или четыре недели или больше.

Средства для RNAi, применимые в способах и композиций, представленных в данном документе, предпочтительно специфически нацеливаются на молекулы РНК (первичные или процессированные) целевого гена APP. Можно получать композиции и осуществлять способы ингибирования экспрессии данных генов с использованием средств для RNAi, описанных в данном документе.

Введение dsRNA в соответствии со способами по настоящему изобретению может приводить к снижению тяжести, интенсивности проявлений признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с ассоциированным с APP нарушением. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, оценки качества жизни, дозы лекарственного препарата, требуемой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего указанному заболеванию, лечение которого осуществляют или предупреждение которого предусматривают. Контроль эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области техники. Например, эффективность лечения ассоциированного с APP нарушения можно оценить, например, путем периодического мониторинга когнитивных функций субъекта, уровней Aβ в CSF и т. д. Сравнение более поздних показателей с первоначальными показателями указывает врачу, эффективным ли является лечение. Контроль эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области техники. Применительно к введению средства для RNAi, нацеливающегося на APP, или фармацевтической композиции на

его основе, «эффективные в отношении» ассоциированного с APP нарушения указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит к благоприятному воздействию у по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, такому как ослабление симптомов, излечение, снижение степени заболевания, продление жизни, улучшение качества жизни или другое воздействие, обычно считающееся положительным врачами, хорошо разбирающимися в лечении ассоциированных с APP нарушений и подобными случаями.

Лечебный или превентивный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или более параметров патологического состояния, или когда отсутствует ухудшение или развитие симптомов в тех случаях, когда они, наоборот, прогнозировались. В качестве примера показателем эффективного лечения может служить благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания на по меньшей мере 10% и предпочтительно на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50% или больше. Об эффективности данного лекарственного средства на основе средства для RNAi или состава с таким лекарственным средством можно также судить с помощью экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна в данной области техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения является доказанной в том случае, если наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

В качестве альтернативы эффективность можно измерять по уменьшению тяжести заболевания, определяемому специалистом в области техники, связанной с диагностикой, исходя из принятой в клинической практике шкалы оценивания тяжести заболевания, причем одним из примеров являются тесты умственных способностей для выявления деменции. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, как измерено с применением соответствующей шкалы, свидетельствует об адекватном лечении с помощью средства для RNAi или состава на основе средства для RNAi, описанных в данном документе.

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

Средство для RNAi можно вводить интратекально, путем интравитреальной инъекции и/или путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени на

регулярной основе. В определенных вариантах осуществления по завершению начальной схемы лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Введение средства для RNAi может снизить уровни APP, например, в клетке, ткани, крови, образце CSF или другом компартменте пациента на по меньшей мере приблизительно 5%, 6, 7, 8, 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, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 39, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере приблизительно 99% или больше. В предпочтительном варианте осуществления введения средства для RNAi может снижать уровни APP, например, в клетке, ткани, крови, образце CSF или другом компартменте пациента, на по меньшей мере 20%.

Перед введением полной дозы средства для RNAi пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% доза для выявления инфузионных реакций, и проводить мониторинг неблагоприятных эффектов, таких как аллергическая реакция. В другом примере можно проводить мониторинг пациента в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, такие как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

В качестве альтернативы средство для RNAi можно вводить подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Для доставки требуемой, например ежемесячной, дозы средства для RNAi субъекту можно использовать одну или более инъекций. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. В определенных вариантах осуществления по завершению начальной схемы лечения лекарственные препараты можно вводить с меньшей частотой. Схема с повторным введением доз может включать введение терапевтического количества средства для RNAi на регулярной основе, как, например, один раз в месяц или растягиваться до одного раза в год или одного раза в 2, 3, 4 и/или 5 лет. В определенных вариантах осуществления средство для RNAi вводят от приблизительно одного раза в месяц до приблизительно одного раза в квартал (т. е. приблизительно один раз в три месяца).

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в

области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практическом осуществлении или тестировании средств для RNAi и способов, представленных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае противоречий, настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Конструирование, синтез, отбор и оценивание in vitro средства для RNAi

В данном примере описаны способы конструирования, синтеза, отбора и оценивания in vitro дополнительных средств для RNAi, нацеливающихся на APP.

Источники реагентов

Если в данном документе конкретно не указан источник реагента, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для молекулярной биологии, при этом он должен характеризоваться качеством/чистотой, стандартным для применения в молекулярной биологии.

Биоинформатика

Набор средств на основе siRNA, нацеливающихся на ген белка-предшественника бета-амилоида человека (APP; эталонная последовательность человека в NCBI NM_201414; NCBI GeneID: 351; SEQ ID NO: 1), а также на ортолог APP от *Macaca fascicularis*, вида для исследований токсичности (яванский макак: XM_005548883.2; SEQ ID NO: 12), конструировали с помощью специально разработанных скриптов на языках R и Python. Все конструкции siRNA характеризуются идеальным совпадением с транскриптом APP человека, а подгруппа характеризуется либо идеальным, либо практически идеальным совпадением с ортологом яванского макака. Длина варианта 2 эталонной последовательности мРНК человека NM_201414 составляет 3423 оснований. Обоснование и способ применения набора конструкций siRNA заключались в

следующем: прогнозируемую эффективность для каждой потенциальной 23-мерной siRNA от положения 10 до конца определяли с помощью модели «случайного леса», полученной при непосредственном измерении нокдауна мРНК для нескольких тысяч различных конструкций siRNA, нацеливающихся на разнообразный набор генов позвоночных. Для каждой нити siRNA специально разработанный скрипт на языке Python использовали в поиске методом «грубой силы» для измерения количества и определения положений ошибочных спариваний между siRNA и всеми потенциальными выравниваниями в транскриптоме человека. Большие вес имели ошибочные спаривания в затравочном участке, определенном в данном случае как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, а также и в сайте расщепления siRNA, определенном в данном случае как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида. Относительный вес ошибочных спариваний составлял 2,8, 1,2, 1 для ошибочных спариваний в затравочной области, сайте расщепления и в других положениях вплоть до положения 19 антисмысловой нити. Ошибочные спаривания в первом положении игнорировали. Оценку специфичности рассчитывали для каждой нити путем суммирования значений для каждой взвешенной ошибки спаривания. Предпочтение имели siRNA, у которых оценка антисмысловой нити для человека и обезьяны составляла ≥3 с прогнозируемой эффективностью, составляющей ≥50% нокдауна (161 последовательность) или с оценкой антисмысловой нити ≥2 и прогнозируемым нокдауном ≥60% (118 последовательностей).

Второй набор siRNA, нацеливающихся на белок-предшественник бета-амилоида *Mus musculus* (мышь), вида для исследований токсичности (App, ортолог APP человека; эталонная последовательность мыши в NCBI NM_001198823; NCBI GeneID: 11820; SEQ ID NO: 13), а также ортолог App *Rattus norvegicus* (крыса): NM_019288.2 (SEQ ID NO: 14), конструировали с помощью специально разработанных скриптов на языках R и Python. Все конструкции siRNA характеризовались идеальным совпадением с транскриптом App мыши, а подгруппа характеризовалась либо идеальным, либо практически идеальным совпадением с ортологом от крысы. Длина варианта 1 эталонной последовательности мРНК мыши NM_001198823 составляет 3377 оснований. Использовали такой же процесс отбора, как описан выше для последовательностей человека, но применяли следующие критерии отбора. Предпочтение отдавали siRNA, у которых оценка антисмысловой нити для мыши и крысы составляла ≥2,8 с прогнозируемой эффективностью, составляющей ≥50%

нокдауна (85 последовательностей), или с оценкой антисмысловой нити ≥2 и прогнозируемым нокдауном ≥61% (8 последовательностей).

Синтез последовательностей APP

Синтез отдельных нитей и дуплексов APP

Все олигонуклеотиды получали на синтезаторе MerMade 192 в масштабе 1 мкмоль с применением универсальных или специально разработанных подложек. Все фосфорамидиты использовали в концентрации 100 мМ в 100% ацетонитриле или смеси 9:1 ацетонитрил:DMF согласно стандартному протоколу для 2-цианоэтилфосфорамидитов, за исключением того, что время связывания продлевали до 400 секунд. Окисление вновь образованных связей проводили с помощью 50 мМ раствора I_2 в смеси 9:1 ацетонитрил:вода для образования фосфатных связей и 100 мМ раствора DDTT в смеси 9:1 пиридин:ацетонитрил для образования фосфотиоатных связей. После синтеза с удалением диметокситритильной защитной группы колонки инкубировали с 150 мкл 40% водного метиламина в течение 45 минут и раствор переносили посредством вакуумного дренажа в 96-луночный планшет. После повторения инкубации и дренажа с использованием свежей порции водного метиламина планшет, содержащий раствор неочищенных олигонуклеотидов, герметизировали и встряхивали при комнатной температуре в течение дополнительных 60 минут до полного удаления всех защитных групп. Осаждение неочищенных олигонуклеотидов завершали путем добавления в каждую лунку по 1,2 мл смеси 9:1 ацетонитрил:EtOH с последующей инкубацией при -20°C на протяжении ночи. Затем планшет центрифугировали при 3000 об/мин в течение 45 минут, из каждой лунки удаляли супернатант и осадки ресуспендировали в 950 мкл 20 мМ водного NaOAc. В конечном итоге каждый неочищенный раствор обессоливали, пропуская через колонку для обессоливания GE Hi-Trap (Sephadex G25 Superfine), с использованием воды для элюирования конечных олигонуклеотидных продуктов. Состав и чистоту всех продуктов подтверждали с применением ESI-MS и IEX HPLC соответственно.

Гибридизацию отдельных нитей APP выполняли на автоматическом устройстве Tecan для манипуляции с жидкостями. Смысловые и антисмысловые одиночные нити объединяли при эквимолярном соотношении в 96-луночных планшетах и забуферивали с помощью 10x PBS с получением конечной концентрации дуплекса, составляющей

10 мкМ в 1x PBS. После объединения отдельных комплементарных нитей 96-луночный планшет герметизировали, и тогда нагревали в печи при 100°C в течение 40 минут и оставляли медленно остывать до комнатной температуры в течение периода 2-3 часов, а затем использовали непосредственно для анализов скрининга *in vitro* в соответствующих концентрациях.

Подробный перечень модифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей APP показан в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B и 26, а подробный перечень немодифицированных последовательностей смысловой и антисмысловой нитей APP показан в таблицах 3, 6, 11, 13, 15 и 26.

Скрининг in vitro на первичных гепатоцитах мыши, яванского макака, клетках Be(2)C и Neuro2A

Культура клеток и выполнение трансфекции

Клетки Be(2)C человека (ATCC), клетки Neuro2A мыши (ATCC), первичные гепатоциты мыши (BioreclamationIVT) и первичные гепатоциты яванского макака (BioreclamationIVT) трансфицировали путем добавления в 384-луночный планшет 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку, в 4 повторностях для каждого дуплекса siRNA, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси siRNA добавляли 40 мкл среды, содержащей ~5 x10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед выделением РНК. Эксперименты с несколькими дозами выполняли при концентрации 10 нМ и 0,1 нМ.

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

РНК выделяли с использованием протокола для автоматизированной платформы BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, № по кат. 61012). Вкратце, в планшет с клетками вносили 70 мкл буфера для лизиса/связывания и 10 мкл буфера для лизиса, содержащего 3 мкл магнитных гранул. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы захватывали, а супернатант удаляли. Затем связанную с гранулой РНК промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и один раз промывочным

буфером B. Затем гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно захватывали и удаляли супернатант.

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

10 мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл10x случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H_2O на реакцию добавляли к РНК, выделенной, как описано выше. Планшеты герметизировали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем в течение 2 ч при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (4326317E), и 0,5 мкл зонда для APP человека (Hs00169098_m1, IDT), и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). Или 2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH мыши (4352339E), и 0,5 мкл зонда для APP мыши (Mm01344172_m1, IDT), и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). Или 2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH яванского макака (прямой праймер: 5′-GCATCCTGGGCTACACTGA-3′, обратный праймер: 5′-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3′, зонд: 5мHEX-CCAGGTGGTCTCCTCC-3′BHQ-1), и 0,5 мкл зонда для APP яванского макака (Mf01552291_m1), и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза и данные нормализовали относительно клеток, трансфицированных с помощью ненацеливающейся контрольной siRNA.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода ΔΔCt и нормализовали относительно

анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью ненацеливающейся контрольной siRNA. Результаты анализов показаны в таблицах 4 и 7.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты.

Будет понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны между собой 5′-3′-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
A	аденозин-3′-фосфат
Agn	(S)-гликоль-аденозин
Ahd	2′-*O*-гексадецил-аденозин-3′-фосфат
Af	2′-фтораденозин-3′-фосфат
Afs	2′-фтораденозин-3′-фосфотиоат
As	аденозин-3′-фосфотиоат
C	цитидин-3′-фосфат
Cgn	(S)-гликоль-цитидин
Chd	2′-*O*-гексадецил-цитидин-3′-фосфат
Cf	2′-фторцитидин-3′-фосфат
Cfs	2′-фторцитидин-3′-фосфотиоат
Cs	цитидин-3′-фосфотиоат
G	гуанозин-3′-фосфат
Ggn	(S)-гликоль-гуанозин
Ghd	2′-*O*-гексадецилгуанозин-3′-фосфат
Gf	2′-фторгуанозин-3′-фосфат
Gfs	2′-фторгуанозин-3′-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3′-фосфотиоат
T	5′-метилуридин-3′-фосфат
Tgn	(S)-гликоль-5’-метилуридин
Tf	2′-фтор-5-метилуридин-3′-фосфат
Tfs	2′-фтор-5-метилуридин-3′-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3′-фосфотиоат
U	уридин-3′-фосфат

Сокращение	Нуклеотид(-ы)
Uhd	2′-*O*-гексадецилуридин-3′-фосфат
Uf	2′-фторуридин-3′-фосфат
Ufs	2′-фторуридин-3′-фосфотиоат
Us	уридин-3′-фосфотиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2′-O-метиладенозин-3′-фосфат
as	2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат
c	2′-O-метилцитидин-3′-фосфат
cs	2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат
g	2′-O-метилгуанозин-3′-фосфат
gs	2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат
t	2′-O-метил-5-метилуридин-3′-фосфат
ts	2′-O-метил-5-метилуридин-3′-фосфотиоат
u	2′-O-метилуридин-3′-фосфат
us	2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол-Hyp-(GalNAc-алкил)3
dT	2′-дезокситимидин-3′-фосфат
dC	2′-дезоксицитидин-3′-фосфат
P	фосфат
VP	винилфосфонат

Таблица 2А. Модифицированные последовательности APP человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392699	gsascccc(Ahd)AfuUfAfAfguccuacuuuL96	33	asAfsagua(Ggn)gacuuaAfuUfgggucsasc	34	GUGACCCAAUUAAGUCCUACUUU	35
AD-392700	uscsucc(Uhd)GfaUfUfAfuuuaucacauL96	36	asUfsguga(Tgn)aaauaaUfcAfggagasgsa	37	UCUCUCCUGAUUAUUUAUCACAU	38
AD-392703	cscsuga(Ahd)CfuUfGfAfauuaauccauL96	39	asUfsggau(Tgn)aauucaAfgUfucaggscsa	40	UGCCUGAACUUGAAUUAAUCCAC	41
AD-392704	gsgsuuc(Ahd)AfaCfAfAfaggugcaauuL96	42	asAfsuugc(Agn)ccuuugUfuUfgaaccscsa	43	UGGGUUCAAACAAAGGUGCAAUC	44
AD-392705	ususuac(Uhd)CfaUfUfAfucgccuuuugL96	45	csAfsaaag(Ggn)cgauaaUfgAfguaaasusc	46	GAUUUACUCAUUAUCGCCUUUUG	47
AD-392707	asususua(Ghd)CfuGfUfAfucaaacuaguL96	48	asCfsuagu(Tgn)ugauacAfgCfuaaaususc	49	GAAUUUAGCUGUAUCAAACUAGU	50
AD-392708	asgsuau(Uhd)CfcUfUfUfccugaucacuL96	51	asGfsugau(Cgn)aggaaaGfgAfauacususa	52	UAAGUAUUCCUUUCCUGAUCACU	53
AD-392709	gscsuua(Uhd)GfaCfAfUfgaucgcuuucL96	54	gsAfsaagc(Ggn)aucaugUfcAfuaagcsasa	55	UUGCUUAUGACAUGAUCGCUUUC	56
AD-392710	asasgau(Ghd)UfgUfCfUfucaauuuguaL96	57	usAfscaaa(Tgn)ugaagaCfaCfaucuusasa	58	UUAAGAUGUGUCUUCAAUUUGUA	59
AD-392711	gscsaaa(Ahd)CfcAfUfUfUfgcuucacuauL96	60	asUfsagug(Agn)agcaauGfgUfuuugcsusg	61	CAGCAAAACCAUUGCUUCACUAC	62
AD-392712	asususua(Chd)UfcAfUfUfaucgccuuuuL96	63	asAfsaagg(Cgn)gauaauGfaGfuaaauscsa	64	UGAUUUACUCAUUAUCGCCUUUU	65
AD-392713	usascuc(Ahd)UfuAfUfCfgccuuuugauL96	66	asUfscaaa(Agn)ggcgauAfaUfgaguasasa	67	UUUACUCAUUAUCGCCUUUUGAC	68
AD-392714	usgsccu(Ghd)AfaCfUfUfgaauuaaucuL96	69	asGfsauua(Agn)uucaagUfuCfaggcasusc	70	GAUGCCUGAACUUGAAUUAAUCC	71
AD-392715	csusgaa(Chd)UfuGfAfAfuuaauccacaL96	72	usGfsugga(Tgn)uaauucAfaGfuucagsgsc	73	GCCUGAACUUGAAUUAAUCCACA	74
AD-392716	ususuag(Chd)UfgUfAfUfcaaacuaguuL96	75	asAfscuag(Tgn)uugauaCfaGfcuaaasusu	76	AAUUUAGCUGUAUCAAACUAGUG	77
AD-392717	gsasaua(Ghd)AfuUfCfUfcuccugauuaL96	78	usAfsauca(Ggn)gagagaAfuCfuauucsasu	79	AUGAAUAGAUUCUCUCCUGAUUA	80
AD-392718	uscscug(Ahd)UfuAfUfUfuaucacauauL96	81	asUfsaugu(Ggn)auaaauAfaUfcaggasgsa	82	UCUCCUGAUUAUUUAUCACAUAG	83
AD-392719	cscscaa(Uhd)UfaAfGfUfccuacuuuauL96	84	asUfsaaag(Tgn)aggacuUfaAfuugggsusc	85	GACCCAAUUAAGUCCUACUUUAC	86
AD-392720	csasuau(Ghd)CfuUfUfAfagaaucgauuL96	87	asAfsucga(Tgn)ucuuaaAfgCfauaugsusa	88	UACAUAUGCUUUAAGAAUCGAUG	89
AD-392721	csusucu(Chd)UfuGfCfCfuaaguauucuL96	90	asGfsaaua(Cgn)uuaggcAfaGfagaagscsa	91	UGCUUCUCUUGCCUAAGUAUUCC	92
AD-392722	csasuug(Chd)UfuAfUfGfacaugaucguL96	93	asCfsgauc(Agn)ugucauAfaGfcaaugsasu	94	AUCAUUGCUUAUGACAUGAUCGC	95
AD-392723	csusuau(Ghd)AfcAfUfGfaucgcuuucuL96	96	asGfsaaag(Cgn)gaucauGfuCfauaagscsa	97	UGCUUAUGACAUGAUCGCUUUCU	98
AD-392724	usasuga(Chd)AfuGfAfUfcgcuuucuauL96	99	asUfsagaa(Agn)gcgaucAfuGfucauasasg	100	CUUAUGACAUGAUCGCUUUCUAC	101
AD-392725	usgsaca(Uhd)GfaUfCfGfcuuucuacauL96	102	asUfsguag(Agn)aagcgaUfcAfugucasusa	103	UAUGACAUGAUCGCUUUCUACAC	104

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392726	gsasucg(Chd)UfuUfCfUfacacuguauuL96	105	asAfsuaca(Ggn)uguagaAfaGfcgaucsasu	106	AUGAUCGCUUUCUACACUGUAUU	107
AD-392727	asasaac(Uhd)AfuUfCfAfgaugacgucuL96	108	asGfsacgu(Cgn)aucugaAfuAfguuuusgsc	109	GCAAAACUAUUCAGAUGACGUCU	110
AD-392728	asasacu(Ahd)UfuCfAfGfaugacgucuuL96	111	asAfsgacg(Tgn)caucugAfaUfaguuususg	112	CAAAACUAUUCAGAUGACGUCUU	113
AD-392729	ascsgaa(Ahd)AfuCfCfAfaccuacaaguL96	114	asCfsuugu(Agn)gguuggAfuUfuucgusasg	115	CUACGAAAAUCCAACCUACAAGU	116
AD-392730	usgscuu(Chd)UfcUfUfGfccuaaguauuL96	117	asAfsuacu(Tgn)aggcaaGfaGfaagcasgsc	118	GCUGCUUCUCUUGCCUAAGUAUU	119
AD-392731	usgscuu(Ahd)UfgAfCfAfugaucgcuuuL96	120	asAfsagcg(Agn)ucauguCfaUfaagcasasu	121	AUUGCUUAUGACAUGAUCGCUUU	122
AD-392732	usgsauc(Ghd)CfuUfUfCfuacacuguauL96	123	asUfsacag(Tgn)guagaaAfgCfgaucasusg	124	CAUGAUCGCUUUCUACACUGUAU	125
AD-392733	asuscgc(Uhd)UfuCfUfAfcacuguauuaL96	126	usAfsauac(Agn)guguagAfaAfgcgauscsa	127	UGAUCGCUUUCUACACUGUAUUA	128
AD-392734	uscsuuu(Ghd)AfcCfGfAfaacgaaaacuL96	129	asGfsuuuu(Cgn)guuucgGfuCfaaagasusg	130	CAUCUUUGACCGAAACGAAAACC	131
AD-392735	gsusucu(Ghd)GfgUfUfGfacaaauaucaL96	132	usGfsauau(Tgn)ugucaaCfcCfagaacscsu	133	AGGUUCUGGGUUGACAAAUAUCA	134
AD-392736	usgsggu(Uhd)GfaCfAfAfauaucaagauL96	135	asUfscuug(Agn)uauuugUfcAfacccasgsa	136	UCUGGGUUGACAAAUAUCAAGAC	137
AD-392737	gsasuuu(Ahd)CfuCfAfUfuaucgccuuuL96	138	asAfsaggc(Ggn)auaaugAfgUfaaaucsasu	139	AUGAUUUACUCAUUAUCGCCUUU	140
AD-392738	uscscuu(Uhd)CfcUfGfAfucacuaugcaL96	141	usGfscaua(Ggn)ugaucaGfgAfaaggasasu	142	AUUCCUUUCCUGAUCACUAUGCA	143
AD-392739	csusuuc(Chd)UfgAfUfCfacuaugcauuL96	144	asAfsugca(Tgn)agugauCfaGfgaaagsgsa	145	UCCUUUCCUGAUCACUAUGCAUU	146
AD-392740	asusugc(Uhd)UfaUfGfAfcaugaucgcuL96	147	asGfscgau(Cgn)augucaUfaAfgcaausgsa	148	UCAUUGCUUAUGACAUGAUCGCU	149
AD-392741	uscsuuu(Ahd)AfcCfAfGfucugaaguuuL96	150	asAfsacuu(Cgn)agacugGfuUfaaagasasa	151	UUUCUUUAACCAGUCUGAAGUUU	152
AD-392742	gsgsauc(Ahd)GfuUfAfCfggaaacgauuL96	153	asAfsucgu(Tgn)uccguaAfcUfgauccsusu	154	AAGGAUCAGUUACGGAAACGAUG	155
AD-392743	csusggg(Uhd)UfgAfCfAfaauaucaagaL96	156	usCfsuuga(Tgn)auuuguCfaAfcccagsasa	157	UUCUGGGUUGACAAAUAUCAAGA	158
AD-392744	asusgau(Uhd)UfaCfUfCfauuaucgccuL96	159	asGfsgcga(Tgn)aaugagUfaAfaucausasa	160	UUAUGAUUUACUCAUUAUCGCCU	161
AD-392745	csusugu(Ghd)GfuUfUfGfugacccaauuL96	162	asAfsuugg(Ggn)ucacaaAfcCfacaagsasa	163	UUCUUGUGGUUUGUGACCCAAUU	164
AD-392746	asusaug(Chd)UfuUfAfAfgaaucgauguL96	165	asCfsaucg(Agn)uucuuaAfaGfcauausgsu	166	ACAUAUGCUUUAAGAAUCGAUGG	167
AD-392747	ususugu(Chd)CfaCfGfUfaucuuuggguL96	168	asCfsccaa(Agn)gauacgUfgGfacaaasasa	169	UUUUUGUCCACGUAUCUUUGGGU	170
AD-392748	uscsauu(Ghd)UfaAfGfCfacuuuuacguL96	171	asCfsguaa(Agn)agugcuUfaCfaaugasasc	172	GUUCAUUGUAAGCACUUUUACGG	173
AD-392749	gsgscca(Ahd)CfaUfGfAfuuagugaacuL96	174	asGfsuuca(Cgn)uaaucaUfgUfuggccsasa	175	UUGGCCAACAUGAUUAGUGAACC	176
AD-392750	gsasuca(Ghd)UfuAfCfGfgaaacgauguL96	177	asCfsaucg(Tgn)uuccguAfaCfugaucscsu	178	AGGAUCAGUUACGGAAACGAUGC	179
AD-392751	usascgg(Ahd)AfaCfGfAfugcucucauuL96	180	asAfsugag(Agn)gcaucgUfuUfccguasasc	181	GUUACGGAAACGAUGCUCUCAUG	182

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392752	usgsauu(Uhd)AfcUfCfAfuuaucgccuuL96	183	asAfsggcg(Agn)uaaugaGfuAfaaucasusa	184	UAUGAUUUACUCAUUAUCGCCUU	185
AD-392753	gsusaga(Uhd)GfcCfUfGfaacuugaauuL96	186	asAfsuuca(Agn)guucagGfcAfucuacsusu	187	AAGUAGAUGCCUGAACUUGAAUU	188
AD-392754	ususgua(Uhd)AfuUfAfUfucuugugguuL96	189	asAfsccac(Agn)agaauaAfuAfuacaascsu	190	AGUUGUAUAUUAUUCUUGUGGUU	191
AD-392755	asusugc(Uhd)GfcUfUfCfugcuauauuuL96	192	asAfsauau(Agn)gcagaaGfcAfgcaauscsu	193	AGAUUGCUGCUUCUGCUAUAUUU	194
AD-392756	usgscua(Uhd)AfuUfUfGfugauauaggaL96	195	usCfscuau(Agn)ucacaaAfuAfuagcasgsa	196	UCUGCUAUAUUUGUGAUAUAGGA	197
AD-392757	ascsaca(Uhd)UfaGfGfCfauugagacuuL96	198	asAfsgucu(Cgn)aaugccUfaAfugugusgsc	199	GCACACAUUAGGCAUUGAGACUU	200
AD-392758	asasgaa(Uhd)CfcCfUfGfuucauuguaaL96	201	usUfsacaa(Tgn)gaacagGfgAfuucuususu	202	AAAAGAAUCCCUGUUCAUUGUAA	203
AD-392759	csasuug(Uhd)AfaGfCfAfcuuuuacgguL96	204	asCfscgua(Agn)aagugcUfuAfcaaugsasa	205	UUCAUUGUAAGCACUUUUACGGG	206
AD-392760	ususgcu(Uhd)AfuGfAfCfaugaucgcuuL96	207	asAfsgcga(Tgn)caugucAfuAfagcaasusg	208	CAUUGCUUAUGACAUGAUCGCUU	209
AD-392761	csasagg(Ahd)UfcAfGfUfuacggaaacuL96	210	asGfsuuuc(Cgn)guaacuGfaUfccuugsgsu	211	ACCAAGGAUCAGUUACGGAAACG	212
AD-392762	asgsguu(Chd)UfgGfGfUfugacaaauauL96	213	asUfsauuu(Ggn)ucaaccCfaGfaaccusgsg	214	CCAGGUUCUGGGUUGACAAAUAU	215
AD-392763	asasgau(Ghd)UfgGfGfUfucaaacaaauL96	216	asUfsuugu(Tgn)ugaaccCfaCfaucuuscsu	217	AGAAGAUGUGGGUUCAAACAAAG	218
AD-392764	csusgaa(Ghd)AfaGfAfAfacaguacacaL96	219	usGfsugua(Cgn)uguuucUfuCfuucagscsa	220	UGCUGAAGAAGAAACAGUACACA	221
AD-392765	asasguu(Ghd)GfaCfAfGfcaaaaccauuL96	222	asAfsuggu(Tgn)uugcugUfcCfaacuuscsa	223	UGAAGUUGGACAGCAAAACCAUU	224
AD-392766	asuscgg(Uhd)GfuCfCfAfuuuauagaauL96	225	asUfsucua(Tgn)aaauggAfcAfccgausgsg	226	CCAUCGGUGUCCAUUUAUAGAAU	227
AD-392767	uscsggu(Ghd)UfcCfAfUfuuauagaauaL96	228	usAfsuucu(Agn)uaaaugGfaCfaccgasusg	229	CAUCGGUGUCCAUUUAUAGAAUA	230
AD-392768	gscsugu(Ahd)AfcAfCfAfaguagaugcuL96	231	asGfscauc(Tgn)acuuguGfuUfacagcsasc	232	GUGCUGUAACACAAGUAGAUGCC	233
AD-392769	asasgua(Ghd)AfuGfCfCfugaacuugaaL96	234	usUfscaag(Tgn)ucaggcAfuCfuacuusgsu	235	ACAAGUAGAUGCCUGAACUUGAA	236
AD-392770	ususgug(Ghd)UfuUfGfUfgacccaauuaL96	237	usAfsauug(Ggn)gucacaAfaCfcacaasgsa	238	UCUUGUGGUUUGUGACCCAAUUA	239
AD-392771	gsusuug(Uhd)GfaCfCfCfaauuaagucuL96	240	asGfsacuu(Agn)auugggUfcAfcaaacscsa	241	UGGUUUGUGACCCAAUUAAGUCC	242
AD-392772	gsusgac(Chd)CfaAfUfUfaaguccuacuL96	243	asGfsuagg(Agn)cuuaauUfgGfgucacsasa	244	UUGUGACCCAAUUAAGUCCUACU	245
AD-392773	usasugc(Uhd)UfuAfAfGfaaucgaugguL96	246	asCfscauc(Ggn)auucuuAfaAfgcauasusg	247	CAUAUGCUUUAAGAAUCGAUGGG	248
AD-392774	ususugu(Ghd)AfuAfUfAfggaauuaagaL96	249	usCfsuuaa(Tgn)uccuauAfuCfacaaasusa	250	UAUUUGUGAUAUAGGAAUUAAGA	251
AD-392775	asasaga(Ahd)UfcCfCfUfguucauuguaL96	252	usAfscaau(Ggn)aacaggGfaUfucuuususc	253	GAAAAGAAUCCCUGUUCAUUGUA	254
AD-392776	usgsauu(Ghd)UfaCfAfGfaaucauugcuL96	255	asGfscaau(Ggn)auucugUfaCfaaucasusc	256	GAUGAUUGUACAGAAUCAUUGCU	257

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392777	usgsccu(Ghd)GfaCfAfAfacccuucuuuL96	258	asAfsagaa(Ggn)gguuugUfcCfaggcasusg	259	CAUGCCUGGACAAACCCUUCUUU	260
AD-392778	gsasgca(Ahd)AfaCfUfAfuucagaugauL96	261	asUfscauc(Tgn)gaauagUfuUfugcucsusu	262	AAGAGCAAAACUAUUCAGAUGAC	263
AD-392779	asgsuga(Ahd)CfcAfAfGfgaucaguuauL96	264	asUfsaacu(Ggn)auccuuGfgUfucacusasa	265	UUAGUGAACCAAGGAUCAGUUAC	266
AD-392780	usgsaac(Chd)AfaGfGfAfucaguuacguL96	267	asCfsguaa(Cgn)ugauccUfuGfguucascsu	268	AGUGAACCAAGGAUCAGUUACGG	269
AD-392781	csasguu(Ahd)CfgGfAfAfacgaugcucuL96	270	asGfsagca(Tgn)cguuucCfgUfaacugsasu	271	AUCAGUUACGGAAACGAUGCUCU	272
AD-392782	asgsaag(Ahd)UfgUfGfGfguucaaacaaL96	273	usUfsguuu(Ggn)aacccaCfaUfcuucusgsc	274	GCAGAAGAUGUGGGUUCAAACAA	275
AD-392783	cscsucu(Ghd)AfaGfUfUfggacagcaaaL96	276	usUfsugcu(Ggn)uccaacUfuCfagaggscsu	277	AGCCUCUGAAGUUGGACAGCAAA	278
AD-392784	ususaug(Ahd)UfuUfAfCfucauuaucguL96	279	asCfsgaua(Agn)ugaguaAfaUfcauaasasa	280	UUUUAUGAUUUACUCAUUAUCGC	281
AD-392785	ascsagc(Uhd)GfuGfCfUfguaacacaauL96	282	asUfsugug(Tgn)uacagcAfcAfgcugucsca	283	UGACAGCUGUGCUGUAACACAAG	284
AD-392786	usgsuga(Chd)CfcAfAfUfuaaguccuauL96	285	asUfsagga(Cgn)uuaauuGfgGfucacasasa	286	UUUGUGACCCAAUUAAGUCCUAC	287
AD-392787	usascau(Ahd)UfgCfUfUfuaagaaucgaL96	288	usCfsgauu(Cgn)uuaaagCfaUfauguasasa	289	UUUACAUAUGCUUUAAGAAUCGA	290
AD-392788	gsusaaa(Uhd)AfaAfUfAfcauucuuggaL96	291	usCfscaag(Agn)auguauUfuAfuuuacsasu	292	AUGUAAAUAAAUACAUUCUUGGA	293
AD-392789	uscsagu(Uhd)AfcGfGfAfaacgaugcuuL96	294	asAfsgcau(Cgn)guuuccGfuAfacugasusc	295	GAUCAGUUACGGAAACGAUGCUC	296
AD-392790	csususcc(Chd)GfuGfAfAfuggagaguuuL96	297	asAfsacuc(Tgn)ccauucAfcGfggaagsgsa	298	UCCUUCCCGUGAAUGGAGAGUUC	299
AD-392791	asgsuug(Ghd)AfcAfGfCfaaaaccauuuL96	300	asAfsaugg(Tgn)uuugcuGfuCfcaacususc	301	GAAGUUGGACAGCAAAACCAUUG	302
AD-392792	cscscau(Chd)GfgUfGfUfccauuuauauL96	303	asUfsauaa(Agn)uggacaCfcGfaugggsusa	304	UACCCAUCGGUGUCCAUUUAUAG	305
AD-392793	usgscac(Ahd)CfaUfUfAfggcauugagaL96	306	usCfsucaa(Tgn)gccuaaUfgUfgugcascsa	307	UGUGCACACAUUAGGCAUUGAGA	308
AD-392794	cscsaac(Ahd)UfgAfUfUfagugaaccaaL96	309	usUfsgguu(Cgn)acuaauCfaUfguuggscsc	310	GGCCAACAUGAUUAGUGAACCAA	311
AD-392795	asusgau(Uhd)AfgUfGfAfaccaaggauuL96	312	asAfsuccu(Tgn)gguucaCfuAfaucausgsu	313	ACAUGAUUAGUGAACCAAGGAUC	314
AD-392796	ususagu(Ghd)AfaCfCfAfaggaucaguuL96	315	asAfscuga(Tgn)ccuuggUfuCfacuaasusc	316	GAUUAGUGAACCAAGGAUCAGUU	317
AD-392797	asascca(Ahd)GfgAfUfCfaguuacggaaL96	318	usUfsccgu(Agn)acugauCfcUfugguuscsa	319	UGAACCAAGGAUCAGUUACGGAA	320
AD-392798	gsusuac(Ghd)GfaAfAfCfgaugcucucaL96	321	usGfsagag(Cgn)aucguuUfcCfguaacsusg	322	CAGUUACGGAAACGAUGCUCUCA	323
AD-392799	gsasugc(Ahd)GfaAfUfUfccgacaugauL96	324	asUfscaug(Tgn)cggaauUfcUfgcaucscsa	325	UGGAUGCAGAAUUCCGACAUGAC	326
AD-392800	ususgga(Chd)AfgCfAfAfaaccauugcuL96	327	asGfscaau(Ggn)guuuugCfuGfuccaascsu	328	AGUUGGACAGCAAAACCAUUGCU	329
AD-392801	asasacc(Ahd)UfuGfCfUfucacuacccaL96	330	usGfsggua(Ggn)ugaagcAfaUfgguuususg	331	CAAAACCAUUGCUUCACUACCCA	332
AD-392802	cscsauc(Ghd)GfuGfUfCfcauuuauagaL96	333	usCfsuaua(Agn)auggacAfcCfgauggsgsu	334	ACCCAUCGGUGUCCAUUUAUAGA	335

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392803	ususauc(Ghd)CfcUfUfUfugacagcuguL96	336	asCfsagcu(Ggn)ucaaaaGfgCfgauaasusg	337	CAUUAUCGCCUUUUGACAGCUGU	338
AD-392804	asuscgc(Chd)UfuUfUfGfacagcuguguL96	339	asCfsacag(Cgn)ugucaaAfaGfgcgausasa	340	UUAUCGCCUUUUGACAGCUGUGC	341
AD-392805	ascsaca(Ahd)GfuAfGfAfugccugaacuL96	342	asGfsuuca(Ggn)gcaucuAfcUfugugususa	343	UAACACAAGUAGAUGCCUGAACU	344
AD-392806	usgsugg(Uhd)UfuGfUfGfacccaauuaaL96	345	usUfsaauu(Ggn)ggucacAfaAfccacasasg	346	CUUGUGGUUUGUGACCCAAUUAA	347
AD-392807	gsgsgau(Ghd)CfuUfCfAfugugaacguuL96	348	asAfscguu(Cgn)acaugaAfgCfaucccscsc	349	GGGGGAUGCUUCAUGUGAACGUG	350
AD-392808	usgsugc(Ahd)CfaCfAfUfuaggcauugaL96	351	usCfsaaug(Cgn)cuaaugUfgUfgcacasusa	352	UAUGUGCACACAUUAGGCAUUGA	353
AD-392809	asasaug(Ghd)AfaGfUfGfgcaauauaauL96	354	asUfsuaua(Tgn)ugccacUfuCfcauuususc	355	GAAAAUGGAAGUGGCAAUAUAAG	356
AD-392810	asusgga(Ahd)GfuGfGfCfaauauaaggguL96	357	asCfscuua(Tgn)auugccAfcUfuccaususu	358	AAAUGGAAGUGGCAAUAUAAGGG	359
AD-392811	usgsccc(Ghd)AfgAfUfCfcuguuaaacuL96	360	asGfsuuua(Agn)caggauCfuCfgggcasasg	361	CUUGCCCGAGAUCCUGUUAAACU	362
AD-392812	asusuag(Uhd)GfaAfCfCfaaggaucaguL96	363	asCfsugau(Cgn)cuugguUfcAfcuaauscsa	364	UGAUUAGUGAACCAAGGAUCAGU	365
AD-392813	gsasacc(Ahd)AfgGfAfUfcaguuacggaL96	366	usCfscgua(Agn)cugaucCfuUfgguucsasc	367	GUGAACCAAGGAUCAGUUACGGA	368
AD-392814	asasgga(Uhd)CfaGfUfUfacggaaacgaL96	369	usCfsguuu(Cgn)cguaacUfgAfuccuusgsg	370	CCAAGGAUCAGUUACGGAAACGA	371
AD-392815	csasaca(Chd)AfgAfAfAfacgaaguugaL96	372	usCfsaacu(Tgn)cguuuuCfuGfuguugsgsc	373	GCCAACACAGAAAACGAAGUUGA	374
AD-392816	usgsggu(Uhd)CfaAfAfCfaaaggugcaaL96	375	usUfsgcac(Cgn)uuuguuUfgAfacccascsa	376	UGUGGGUUCAAACAAAGGUGCAA	377
AD-392817	csasgug(Ahd)UfcGfUfCfaucaccuuguL96	378	asCfsaagg(Tgn)gaugacGfaUfcacugsusc	379	GACAGUGAUCGUCAUCACCUUGG	380
AD-392818	ascscca(Uhd)CfgGfUfGfuccauuuauaL96	381	usAfsuaaa(Tgn)ggacacCfgAfugggusasg	382	CUACCCAUCGGUGUCCAUUUAUA	383
AD-392819	uscsuug(Uhd)GfgUfUfUfgugacccaauL96	384	asUfsuggg(Tgn)cacaaaCfcAfcaagasasu	385	AUUCUUGUGGUUUGUGACCCAAU	386
AD-392820	ususugu(Ghd)AfcCfCfAfauuaaguccuL96	387	asGfsgacu(Tgn)aauuggGfuCfacaaascsc	388	GGUUUGUGACCCAAUUAAGUCCU	389
AD-392821	ususgug(Ahd)CfcCfAfAfuuaaguccuaL96	390	usAfsggac(Tgn)uaauugGfgUfcacaasasc	391	GUUUGUGACCCAAUUAAGUCCUA	392
AD-392822	ususcag(Ahd)UfgAfCfGfucuuggccaaL96	393	usUfsggcc(Agn)agacguCfaUfcugaasusa	394	UAUUCAGAUGACGUCUUGGCCAA	395
AD-392823	asuscag(Uhd)UfaCfGfGfaaacgaugcuL96	396	asGfscauc(Ggn)uuuccgUfaAfcugauscsc	397	GGAUCAGUUACGGAAACGAUGCU	398
AD-392824	usgsgau(Ghd)CfaGfAfAfuuccgacauuL96	399	asAfsuguc(Ggn)gaauucUfgCfauccasusc	400	GAUGGAUGCAGAAUUCCGACAUG	401
AD-392825	gsuscca(Ahd)GfaUfGfCfagcagaacguL96	402	asCfsguuc(Tgn)gcugcaUfcUfuggacsasg	403	CUGUCCAAGAUGCAGCAGAACGG	404
AD-392826	usasccc(Ahd)UfcGfGfUfguccauuuauL96	405	asUfsaaau(Ggn)gacaccGfaUfggguasgsu	406	ACUACCCAUCGGUGUCCAUUUAU	407
AD-392827	ususuug(Ahd)CfaGfCfUfgugcuguaauL96	408	asUfsuaca(Ggn)cacagcUfgUfcaaaasgsg	409	CCUUUUGACAGCUGUGCUGUAAC	410
AD-392828	ususgac(Ahd)GfcUfGfUfgcuguaacauL96	411	asUfsguua(Cgn)agcacaGfcUfgucaasasa	412	UUUUGACAGCUGUGCUGUAACAC	413

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392829	asgscug(Uhd)GfcUfGfUfaacacaaguaL96	414	usAfscuug(Tgn)guuacaGfcAfcagcusgsu	415	ACAGCUGUGCUGUAACACAAGUA	416
AD-392830	gsusuuu(Ahd)UfgUfGfCfacacauuaguL96	417	asCfsuaau(Ggn)ugugcaCfaUfaaaacsasg	418	CUGUUUUAUGUGCACACAUUAGG	419
AD-392831	ususcaa(Uhd)UfaCfCfAfagaauucucuL96	420	asGfsagaa(Tgn)ucuuggUfaAfuugaasgsa	421	UCUUCAAUUACCAAGAAUUCUCC	422
AD-392832	csascac(Ahd)UfcAfGfUfaauguauucuL96	423	asGfsaaua(Cgn)auuacuGfaUfgugugsgsa	424	UCCACACAUCAGUAAUGUAUUCU	425
AD-392833	usgsguc(Uhd)CfuAfUfAfcuacauuauuL96	426	asAfsuaau(Ggn)uaguauAfgAfgaccasasa	427	UUUGGUCUCUAUACUACAUUAUU	428
AD-392834	ascsccg(Uhd)UfuUfAfUfgauuuacucaL96	429	usGfsagua(Agn)aucauaAfaAfcgggususu	430	AAACCCGUUUUAUGAUUUACUCA	431
AD-392835	usascga(Ahd)AfaUfCfCfaaccuacaauL96	432	asUfsugua(Ggn)guuggaUfuUfucguasgsc	433	GCUACGAAAAUCCAACCUACAAG	434
AD-392836	uscscac(Ahd)CfaUfCfAfguaauguauuL96	435	asAfsuaca(Tgn)uacugaUfgUfguggasusu	436	AAUCCACACAUCAGUAAUGUAUU	437
AD-392837	csusggu(Chd)UfuCfAfAfuuaccaagaaL96	438	usUfscuug(Ggn)uaauugAfaGfaccagscsa	439	UGCUGGUCUUCAAUUACCAAGAA	440
AD-392838	gscscau(Chd)UfuUfGfAfccgaaacgaaL96	441	usUfscguu(Tgn)cggucaAfaGfauggcsasu	442	AUGCCAUCUUUGACCGAAACGAA	443
AD-392839	cscsauc(Uhd)UfuGfAfCfcgaaacgaaaL96	444	usUfsucgu(Tgn)ucggucAfaAfgauggscsa	445	UGCCAUCUUUGACCGAAACGAAA	446
AD-392840	csusacg(Ahd)AfaAfUfCfcaaccuacaaL96	447	usUfsguag(Ggn)uuggauUfuUfcguagscsc	448	GGCUACGAAAAUCCAACCUACAA	449
AD-392841	asuscca(Chd)AfcAfUfCfaguaauguauL96	450	asUfsacau(Tgn)acugauGfuGfuggaususa	451	UAAUCCACACAUCAGUAAUGUAU	452
AD-392842	csasugc(Chd)AfuCfUfUfugaccgaaauL96	453	asUfsuucg(Ggn)ucaaagAfuGfgcaugsasg	454	CUCAUGCCAUCUUUGACCGAAAC	455
AD-392843	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuauL96	456	asUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	457	ACGGCUACGAAAAUCCAACCUAC	458
AD-392844	uscsaug(Chd)CfaUfCfUfuugaccgaaaL96	459	usUfsucgg(Tgn)caaagaUfgGfcaugasgsa	460	UCUCAUGCCAUCUUUGACCGAAA	461
AD-392845	csasgua(Chd)AfcAfUfCfcauucaucauL96	462	asUfsgaug(Agn)auggauGfuGfuacugsusu	463	AACAGUACACAUCCAUUCAUCAU	464
AD-392846	asascgg(Chd)UfaCfGfAfaaauccaacuL96	465	asGfsuugg(Agn)uuuucgUfaGfccguuscsu	466	AGAACGGCUACGAAAAUCCAACC	467
AD-392847	gsasagu(Uhd)UfcAfUfUfuaugauacaaL96	468	usUfsguau(Cgn)auaaauGfaAfacuucsasg	469	CUGAAGUUUCAUUUAUGAUACAA	470
AD-392848	asusgcc(Ahd)UfcUfUfUfgaccgaaacuL96	471	asGfsuuuc(Ggn)gucaaaGfaUfggcausgsa	472	UCAUGCCAUCUUUGACCGAAACG	473
AD-392849	gsasacg(Ghd)CfuAfCfCfgfaaaauccaauL96	474	asUfsugga(Tgn)uuucguAfgCfcguucsusg	475	CAGAACGGCUACGAAAAUCCAAC	476
AD-392850	uscsuuc(Ghd)UfgCfCfUfguuuuauguuL96	477	asAfscaua(Agn)aacaggCfaCfgaagasasa	478	UUUCUUCGUGCCUGUUUUAUGUG	479
AD-392851	ususgcc(Chd)GfaGfAfUfccuguuaaauL96	480	asUfsuuaa(Cgn)aggaucUfcGfggcaasgsa	481	UCUUGCCCGAGAUCCUGUUAAAC	482
AD-392852	csusucg(Uhd)GfcCfUfGfuuuuauguguL96	483	asCfsacau(Agn)aaacagGfcAfcgaagsasa	484	UUCUUCGUGCCUGUUUUAUGUGC	485
AD-392853	gscsgcc(Ahd)UfgUfCfCfcaaaguuuauL96	486	asUfsaaac(Tgn)uuugggaCfaUfggcgcsusg	487	CAGCGCCAUGUCCCAAAGUUUAC	488
AD-392854	gsuscau(Ahd)GfcGfAfCfagugaucguuL96	489	asAfscgau(Cgn)acugucGfcUfaugacsasa	490	UUGUCAUAGCGACAGUGAUCGUC	491

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392855	gscsuac(Ghd)AfaAfAfUfccaaccuacaL96	492	usGfsuagg(Tgn)uggauuUfuCfguagcscsg	493	CGGCUACGAAAAUCCAACCUACA	494
AD-392856	asusagc(Ghd)AfcAfGfUfgaucgucauuL96	495	asAfsugac(Ggn)aucacuGfuCfgcuausgsa	496	UCAUAGCGACAGUGAUCGUCAUC	497
AD-392857	csusugc(Chd)CfgAfGfAfuccuguuaaaL96	498	usUfsuaac(Agn)ggaucuCfgGfgcaagsasg	499	CUCUUGCCCGAGAUCCUGUUAAA	500
AD-392858	csuscau(Ghd)CfcAfUfCfuuugaccgaaL96	501	usUfscggu(Cgn)aaagauGfgCfaugagsasg	502	CUCUCAUGCCAUCUUUGACCGAA	503
AD-392859	ascsggc(Uhd)AfcGfAfAfaauccaaccuL96	504	asGfsguug(Ggn)auuuucGfuAfgccgususc	505	GAACGGCUACGAAAAUCCAACCU	506
AD-392860	csasuca(Ahd)AfaAfUfUfgguguucuuuL96	507	asAfsagaa(Cgn)accaauUfuUfugaugsasu	508	AUCAUCAAAAAUUGGUGUUCUUU	509
AD-392861	asuscca(Ahd)CfcUfAfCfaaguucuuugL96	510	csAfsaaga(Agn)cuuguaGfgUfuggaususu	511	AAAUCCAACCUACAAGUUCUUUG	512
AD-392862	csgscuu(Uhd)CfuAfCfAfcuguauuacaL96	513	usGfsuaau(Agn)caguguAfgAfaagcgsasu	514	AUCGCUUUCUACACUGUAUUACA	515
AD-392863	uscscaa(Chd)CfuAfCfAfaguucuuugaL96	516	usCfsaaag(Agn)acuuguAfgGfuuggasusu	517	AAUCCAACCUACAAGUUCUUUGA	518
AD-392864	uscsucu(Chd)UfuUfAfCfauuuuggucuL96	519	asGfsacca(Agn)aauguaAfaGfagagasusa	520	UAUCUCUCUUUACAUUUUGGUCU	521
AD-392865	csuscuc(Uhd)UfuAfCfAfuuuuggucuuL96	522	asAfsgacc(Agn)aaauguAfaAfgagagsasu	523	AUCUCUCUUUACAUUUUGGUCUC	524
AD-392866	ususugu(Ghd)UfaCfUfGfuaaagaauuuL96	525	asAfsauuc(Tgn)uuacagUfaCfacaaasasc	526	GUUUUGUGUACUGUAAAGAAUUU	527
AD-392867	gsusgua(Chd)UfgUfAfAfagaauuuaguL96	528	asCfsuaaa(Tgn)ucuuuaCfaGfuacacsasa	529	UUGUGUACUGUAAAGAAUUUAGC	530
AD-392868	ascscca(Ahd)UfuAfAfGfuccuacuuuaL96	531	usAfsaagu(Agn)ggacuuAfaUfuggguscsa	532	UGACCCAAUUAAGUCCUACUUUA	533
AD-392869	uscscua(Chd)UfuUfAfCfauaugcuuuaL96	534	usAfsaagc(Agn)uauguaAfaGfuaggascsu	535	AGUCCUACUUUACAUAUGCUUUA	536
AD-392870	cscsuac(Uhd)UfuAfCfAfuaugcuuuaaL96	537	usUfsaaag(Cgn)auauguAfaAfguaggsasc	538	GUCCUACUUUACAUAUGCUUUAA	539
AD-392871	ususcua(Chd)AfcUfGfUfauuacauaaaL96	540	usUfsuaug(Tgn)aauacaGfuGfuagaasasg	541	CUUUCUACACUGUAUUACAUAAA	542
AD-392872	uscsuac(Ahd)CfuGfUfAfuuacauaaauL96	543	asUfsuuau(Ggn)uaauacAfgUfguagasasa	544	UUUCUACACUGUAUUACAUAAAU	545
AD-392873	csusuuu(Ahd)AfgAfUfGfugucuucaauL96	546	asUfsugaa(Ggn)acacauCfuUfaaaagsasa	547	UUCUUUUAAGAUGUGUCUUCAAU	548
AD-392874	asusgug(Uhd)CfuUfCfAfauuuguauaaL96	549	usUfsauac(Agn)aauugaAfgAfcacauscsu	550	AGAUGUGUCUUCAAUUUGUAUAA	551
AD-392875	asuscaa(Ahd)AfaUfUfGfguguucuuugL96	552	csAfsaaga(Agn)caccaaUfuUfuugausgsa	553	UCAUCAAAAAUUGGUGUUCUUUG	554
AD-392876	asasauc(Chd)AfaCfCfUfacaaguucuuL96	555	asAfsgaac(Tgn)uguaggUfuGfgauuususc	556	GAAAAUCCAACCUACAAGUUCUU	557
AD-392877	gsusacu(Ghd)UfaAfAfGfaauuuagcuuL96	558	asAfsgcua(Agn)auucuuUfaCfaguacsasc	559	GUGUACUGUAAAGAAUUUAGCUG	560
AD-392878	csusccu(Ghd)AfuUfAfUfuuaucacauaL96	561	usAfsugug(Agn)uaaauaAfuCfaggagsasg	562	CUCUCCUGAUUAUUUAUCACAUA	563
AD-392879	gscscag(Uhd)UfgUfAfUfauuauucuuuL96	564	asAfsagaa(Tgn)aauauaCfaAfcuggcsusa	565	UAGCCAGUUGUAUAUUAUUCUUG	566
AD-392880	asasuua(Ahd)GfuCfCfUfacuuuacauaL96	567	usAfsugua(Agn)aguaggAfcUfuaauusgsg	568	CCAAUUAAGUCCUACUUUACAUA	569

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392881	csusugc(Chd)UfaAfGfUfauuccuuucuL96	570	asGfsaaag(Ggn)aauacuUfaGfgcaagsasg	571	CUCUUGCCUAAGUAUUCCUUUCC	572
AD-392882	asususcc(Uhd)UfuCfCfUfgaucacuauuL96	573	asAfsuagu(Ggn)aucaggAfaAfggaausasc	574	GUAUUCCUUUCCUGAUCACUAUG	575
AD-392883	ascsuau(Ghd)CfaUfUfUfuaaaguuaaaL96	576	usUfsuaac(Tgn)uuaaaaUfgCfauagusgsa	577	UCACUAUGCAUUUUAAAGUUAAA	578
AD-392884	usgsuuc(Ahd)UfuGfUfAfagcacuuuuaL96	579	usAfsaaag(Tgn)gcuuacAfaUfgaacasgsg	580	CCUGUUCAUUGUAAGCACUUUUA	581
AD-392885	asasuua(Chd)CfaAfGfAfauucuccaaaL96	582	usUfsugga(Ggn)aauucuUfgGfuaauusgsa	583	UCAAUUACCAAGAAUUCUCCAAA	584
AD-392886	ususacc(Ahd)AfgAfAfUfucuccaaaauL96	585	asUfsuuug(Ggn)agaauuCfuUfgguaasusu	586	AAUUACCAAGAAUUCUCCAAAAC	587
AD-392887	uscsauu(Ghd)CfuUfAfUfgacaugaucuL96	588	asGfsauca(Tgn)gucauaAfgCfaaugasusu	589	AAUCAUUGCUUAUGACAUGAUCG	590
AD-392889	ususuua(Ahd)GfaUfGfUfgucuucaauuL96	591	asAfsuuga(Agn)gacacaUfcUfuaaaasgsa	592	UCUUUUAAGAUGUGUCUUCAAUU	593
AD-392890	asusccu(Ghd)UfuAfAfAfcuuccuacaaL96	594	usUfsguag(Ggn)aaguuuAfaCfaggauscsu	595	AGAUCCUGUUAAACUUCCUACAA	596
AD-392891	ascsuau(Uhd)CfaGfAfUfgacgucuuguL96	597	asCfsaaga(Cgn)gucaucUfgAfauagususu	598	AAACUAUUCAGAUGACGUCUUGG	599
AD-392892	gsusuca(Uhd)CfaUfCfAfaaaauugguuL96	600	asAfsccaa(Tgn)uuuugaUfgAfugaacsusu	601	AAGUUCAUCAUCAAAAAUUGGUG	602
AD-392893	usasucu(Chd)UfcUfUfUfacauuuugguL96	603	asCfscaaa(Agn)uguaaaGfaGfagauasgsa	604	UCUAUCUCUCUUUACAUUUUGGU	605
AD-392894	asuscuc(Uhd)CfuUfUfAfcauuuugguuL96	606	asAfsccaa(Agn)auguaaAfgAfgagausasg	607	CUAUCUCUCUUUACAUUUUGGUC	608
AD-392895	usgsugu(Ahd)CfuGfUfAfaagaauuuauL96	609	asUfsaaau(Tgn)cuuuacAfgUfacacasasa	610	UUUGUGUACUGUAAAGAAUUUAG	611
AD-392896	csusacu(Uhd)UfaCfAfUfaugcuuuaauL96	612	asUfsuaaa(Ggn)cauaugUfaAfaguagsgsa	613	UCCUACUUUACAUAUGCUUUAAG	614
AD-392897	usgsccu(Ahd)AfgUfAfUfuccuuuccuuL96	615	asAfsggaa(Agn)ggaauaCfuUfaggcasasg	616	CUUGCCUAAGUAUUCCUUUCCUG	617
AD-392898	asasgua(Uhd)UfcCfUfUfuccugaucauL96	618	asUfsgauc(Agn)ggaaagGfaAfuacuusasg	619	CUAAGUAUUCCUUUCCUGAUCAC	620
AD-392899	gsusauu(Chd)CfuUfUfCfcugaucacuaL96	621	usAfsguga(Tgn)caggaaAfgGfaauacsusu	622	AAGUAUUCCUUUCCUGAUCACUA	623
AD-392900	ususccu(Ghd)AfuCfAfCfuaugcauuuuL96	624	asAfsaaug(Cgn)auagugAfuCfaggaasasg	625	CUUUCCUGAUCACUAUGCAUUUU	626
AD-392901	csusgau(Chd)AfcUfAfUfgcauuuuaaaL96	627	usUfsuaaa(Agn)ugcauaGfuGfaucagsgsa	628	UCCUGAUCACUAUGCAUUUUAAA	629
AD-392902	csascgu(Ahd)UfcUfUfUfgggucuuugaL96	630	usCfsaaag(Agn)cccaaaGfaUfacgugsgsa	631	UCCACGUAUCUUUGGGUCUUUGA	632
AD-392903	usgsggu(Chd)UfuUfGfAfuaaagaaaauL96	633	asUfsuuuc(Tgn)uuaucaAfaGfacccasasa	634	UUUGGGUCUUUGAUAAAGAAAAG	635
AD-392904	uscsaau(Uhd)AfcCfAfAfgaauucuccaL96	636	usGfsgaga(Agn)uucuugGfuAfauugasasg	637	CUUCAAUUACCAAGAAUUCUCCA	638
AD-392906	uscsgcu(Uhd)UfcUfAfCfacuguauuauL96	639	asUfsaaua(Cgn)aguguaGfaAfagcgasusc	640	GAUCGCUUUCUACACUGUAUUAC	641
AD-392907	asusuuu(Chd)UfuUfAfAfccagucugaaL96	642	usUfscaga(Cgn)ugguuaAfaGfaaaaususg	643	CAAUUUUCUUUAACCAGUCUGAA	644
AD-392908	csusuua(Ahd)CfcAfGfUfcugaaguuucL96	645	gsAfsaacu(Tgn)cagacuGfgUfuaaagsasa	646	UUCUUUAACCAGUCUGAAGUUUC	647

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392909	usasaga(Uhd)GfuGfUfCfuucaauuuguL96	648	asCfsaaau(Tgn)gaagacAfcAfucuuasasa	649	UUUAAGAUGUGUCUUCAAUUUGU	650
AD-392910	gsasucc(Uhd)GfuUfAfAfacuuccuacaL96	651	usGfsuagg(Agn)aguuuaAfcAfggaucsusc	652	GAGAUCCUGUUAAACUUCCUACA	653
AD-392911	csusgcu(Uhd)CfaGfAfAfagagcaaaauL96	654	asUfsuuug(Cgn)ucuuucUfgAfagcagscsu	655	AGCUGCUUCAGAAAGAGCAAAAC	656
AD-392912	csasgaa(Ahd)GfaGfCfAfaaacuauucaL96	657	usGfsaaua(Ggn)uuuugcUfcUfuucugsasa	658	UUCAGAAAGAGCAAAACUAUUCA	659
AD-392913	usasuga(Ahd)GfuUfCfAfucaucaaaaaL96	660	usUfsuuug(Agn)ugaugaAfcUfucauasusc	661	GAUAUGAAGUUCAUCAUCAAAAA	662
AD-392914	csasuca(Uhd)CfaAfAfAfauuggugguuuL96	663	asAfsacac(Cgn)aauuuuUfgAfugaugsasa	664	UUCAUCAUCAAAAAUUGGUGUUC	665
AD-392915	uscsaaa(Ahd)AfuUfGfGfuguucuuuguL96	666	asCfsaaag(Agn)acaccaAfuUfuuugasusg	667	CAUCAAAAAUUGGUGUUCUUUGC	668
AD-392916	asasaau(Chd)CfaAfCfCfuacaaguucuL96	669	asGfsaacu(Tgn)guagguUfgGfauuuuscsg	670	CGAAAAUCCAACCUACAAGUUCU	671
AD-392917	cscsaac(Chd)UfaCfAfAfguucuuugauL96	672	asUfscaaa(Ggn)aacuugUfaGfguuggsasu	673	AUCCAACCUACAAGUUCUUUGAG	674
AD-392918	ascsuca(Uhd)UfaUfCfGfccuuuugacaL96	675	usGfsucaa(Agn)aggcgaUfaAfugagusasa	676	UUACUCAUUAUCGCCUUUUGACA	677
AD-392919	csuscau(Uhd)AfuCfGfCfcuuuugacauL96	678	asUfsguca(Agn)aaggcgAfuAfaugagsusa	679	UACUCAUUAUCGCCUUUUGACAG	680
AD-392920	usgsugc(Uhd)GfuAfAfCfacaaguagauL96	681	asUfscuac(Tgn)uguguuAfcAfgcacasgsc	682	GCUGUGCUGUAACACAAGUAGAU	683
AD-392921	gsusgcu(Ghd)UfaAfCfAfcaaguagauuL96	684	asAfsucua(Cgn)uuguguUfaCfagcacsasg	685	CUGUGCUGUAACACAAGUAGAUG	686
AD-392922	uscsuuu(Ahd)CfaUfUfUfuggucucuauL96	687	asUfsagag(Agn)ccaaaaUfgUfaaagasgsa	688	UCUCUUUACAUUUUGGUCUCUAU	689
AD-392923	asusggg(Uhd)UfuUfGfUfguacuguaaaL96	690	usUfsuaca(Ggn)uacacaAfaAfcccaususa	691	UAAUGGGUUUUGUGUACUGUAAA	692
AD-392924	ususgug(Uhd)AfcUfGfUfaaagaauuuaL96	693	usAfsaauu(Cgn)uuuacaGfuAfcacaasasa	694	UUUUGUGUACUGUAAAGAAUUUA	695
AD-392925	gscsugu(Ahd)UfcAfAfAfcuagugcauuL96	696	asAfsugca(Cgn)uaguuuGfaUfacagcsusa	697	UAGCUGUAUCAAACUAGUGCAUG	698
AD-392926	csusagu(Ghd)CfaUfGfAfauagauucuuL96	699	asAfsgaau(Cgn)uauucaUfgCfacuagsusu	700	AACUAGUGCAUGAAUAGAUUCUC	701
AD-392927	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucuL96	702	asGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	703	ACUAGUGCAUGAAUAGAUUCUCU	704
AD-392928	csuscuc(Chd)UfgAfUfUfauuuaucacaL96	705	usGfsugau(Agn)aauaauCfaGfgagagsasa	706	UUCUCUCCUGAUUAUUUAUCACA	707
AD-392929	cscsuga(Uhd)UfaUfUfUfaucacauaguL96	708	asCfsuaug(Tgn)gauaaaUfaAfucaggsasg	709	CUCCUGAUUAUUUAUCACAUAGC	710
AD-392930	usasagu(Chd)CfuAfCfUfuuacauauguL96	711	asCfsauau(Ggn)uaaaguAfgGfacuuasasu	712	AUUAAGUCCUACUUUACAUAUGC	713
AD-392931	asgsucc(Uhd)AfcUfUfUfacauaugcuuL96	714	asAfsgcau(Agn)uguaaaGfuAfggacususa	715	UAAGUCCUACUUUACAUAUGCUU	716
AD-392932	gsusccu(Ahd)CfuUfUfAfcauaugcuuuL96	717	asAfsagca(Tgn)auguaaAfgUfaggacsusu	718	AAGUCCUACUUUACAUAUGCUUU	719
AD-392933	ususcuc(Uhd)UfgCfCfUfaaguauuccuL96	720	asGfsgaau(Agn)cuuaggCfaAfgagaasgsc	721	GCUUCUCUUGCCUAAGUAUUCCU	722
AD-392934	csuscuu(Ghd)CfcUfAfAfguauuccuuuL96	723	asAfsagga(Agn)uacuuaGfgCfaagagsasa	724	UUCUCUUGCCUAAGUAUUCCUUU	725

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392935	usasuuc(Chd)UfuUfCfCfugaucacuauL96	726	asUfsagug(Agn)ucaggaAfaGfgaauascsu	727	AGUAUUCCUUUCCUGAUCACUAU	728
AD-392936	ususucc(Uhd)GfaUfCfAfcuaugcauuuL96	729	asAfsaugc(Agn)uagugaUfcAfggaaasgsg	730	CCUUUCCUGAUCACUAUGCAUUU	731
AD-392937	csascua(Uhd)GfcAfUfUfuuaaaguuaaL96	732	usUfsaacu(Tgn)uaaaauGfcAfuagugsasu	733	AUCACUAUGCAUUUUAAAGUUAA	734
AD-392938	csusgca(Uhd)UfuUfAfCfuguacagauuL96	735	asAfsucug(Tgn)acaguaAfaAfugcagsusc	736	GACUGCAUUUUACUGUACAGAUU	737
AD-392939	ususcug(Chd)UfaUfAfUfuugugauauaL96	738	usAfsuauc(Agn)caaauaUfaGfcagaasgsc	739	GCUUCUGCUAUAUUUGUGAUAUA	740
AD-392940	uscsugc(Uhd)AfuAfUfUfugugauauauL96	741	asUfsauau(Cgn)acaaauAfuAfgcagasasg	742	CUUCUGCUAUAUUUGUGAUAUAG	743
AD-392941	ascsgua(Uhd)CfuUfUfGfggucuuugauL96	744	asUfscaaa(Ggn)acccaaAfgAfuacgusgsg	745	CCACGUAUCUUUGGGUCUUUGAU	746
AD-392942	uscsuuu(Ghd)GfgUfCfUfuugauaaagaL96	747	usCfsuuua(Tgn)caaagaCfcCfaaagasusa	748	UAUCUUUGGGUCUUUGAUAAAGA	749
AD-392943	csusuug(Ghd)GfuCfUfUfugauaaagaaL96	750	usUfscuuu(Agn)ucaaagAfcCfcaaagsasu	751	AUCUUUGGGUCUUUGAUAAAGAA	752
AD-392944	ususggg(Uhd)CfuUfUfGfauaaagaaaaL96	753	usUfsuucu(Tgn)uaucaaAfgAfcccaasasg	754	CUUUGGGUCUUUGAUAAAGAAAA	755
AD-392945	asgsaau(Chd)CfcUfGfUfucauuguaauL96	756	asUfsuaca(Agn)ugaacaGfgGfauucususu	757	AAAGAAUCCCUGUUCAUUGUAAG	758
AD-392946	gsasauc(Chd)CfuGfUfUfcauuguaaguL96	759	asCfsuuac(Agn)augaacAfgGfgauucsusu	760	AAGAAUCCCUGUUCAUUGUAAGC	761
AD-392947	gsususca(Uhd)UfgUfAfAfgcacuuuuauL96	762	asUfsaaaa(Ggn)ugcuuaCfaAfugaacsasg	763	CUGUUCAUUGUAAGCACUUUUAC	764
AD-392948	ususaug(Ahd)CfaUfGfAfucgcuuucuaL96	765	usAfsgaaa(Ggn)cgaucaUfgUfcauaasgsc	766	GCUUAUGACAUGAUCGCUUUCUA	767
AD-392949	asusgac(Ahd)UfgAfUfCfgcuuucuacaL96	768	usGfsuaga(Agn)agcgauCfaUfgucausasa	769	UUAUGACAUGAUCGCUUUCUACA	770
AD-392950	csasuga(Uhd)CfgCfUfUfucuacacuguL96	771	asCfsagug(Tgn)agaaagCfgAfucaugsusc	772	GACAUGAUCGCUUUCUACACUGU	773
AD-392951	csususc(Uhd)AfcAfCfUfguauuacauaL96	774	usAfsugua(Agn)uacaguGfuAfgaaagscsg	775	CGCUUUCUACACUGUAUUACAUA	776
AD-392952	gsasuuc(Ahd)AfuUfUfUfcuuuaaccauL96	777	asUfsgguu(Agn)aagaaaAfuUfgaaucsusg	778	CAGAUUCAAUUUUCUUUAACCAG	779
AD-392953	ususucu(Uhd)UfaAfCfCfagucugaaguL96	780	asCfsuuca(Ggn)acugguUfaAfagaaasasu	781	AUUUUCUUUAACCAGUCUGAAGU	782
AD-392954	ususuaa(Ghd)AfuGfUfGfucuucaauuuL96	783	asAfsauug(Agn)agacacAfuCfuuaaasasg	784	CUUUUAAGAUGUGUCUUCAAUUU	785
AD-392955	ususaag(Ahd)UfgUfGfUfcuucaauuugL96	786	csAfsaauu(Ggn)aagacaCfaUfcuuaasasa	787	UUUUAAGAUGUGUCUUCAAUUUG	788
AD-392956	asgsaug(Uhd)GfuCfUfUfcaauuuguauL96	789	asUfsacaa(Agn)uugaagAfcAfcaucususa	790	UAAGAUGUGUCUUCAAUUUGUAU	791
AD-392957	usgsucu(Uhd)CfaAfUfUfuguauaaaauL96	792	asUfsuuua(Tgn)acaaauUfgAfagacascsa	793	UGUGUCUUCAAUUUGUAUAAAAU	794
AD-392958	csususca(Ahd)UfuUfGfUfauaaaaugguL96	795	asCfscauu(Tgn)uauacaAfaUfugaagsasc	796	GUCUUCAAUUUGUAUAAAAUGGU	797
AD-392959	asusggu(Ghd)UfuUfUfCfauguaaauaaL96	798	usUfsauuu(Agn)caugaaAfaCfaccaususu	799	AAAUGGUGUUUUCAUGUAAAUAA	800
AD-392960	ususcuu(Uhd)UfaAfGfAfugugucuucaL96	801	usGfsaaga(Cgn)acaucuUfaAfaagaasgsg	802	CCUUCUUUUAAGAUGUGUCUUCA	803

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392961	usgsuau(Uhd)CfuAfUfCfucucuuuacaL96	804	usGfsuaaa(Ggn)agagauAfgAfauacasusu	805	AAUGUAUUCUAUCUCUCUUUACA	806
AD-392962	gsuscuc(Uhd)AfuAfCfUfacauuauuaaL96	807	usUfsaaua(Agn)uguaguAfuAfgagacscsa	808	UGGUCUCUAUACUACAUUAUUAA	809
AD-392963	uscsucu(Ahd)UfaCfUfAfcauuauuaauL96	810	asUfsuaau(Agn)auguagUfaUfagagascsc	811	GGUCUCUAUACUACAUUAUUAAU	812
AD-392964	csuscua(Uhd)AfcUfAfCfauuauuaauuL96	813	asAfsuuaa(Tgn)aauguaGfuAfuagagsasc	814	GUCUCUAUACUACAUUAUUAAUG	815
AD-392965	csusuca(Ahd)UfuAfCfCfaagaauucuuL96	816	asAfsgaau(Tgn)cuugguAfaUfugaagsasc	817	GUCUUCAAUUACCAAGAAUUCUC	818
AD-392966	cscsaca(Chd)AfuCfAfGfuaauguauuuL96	819	asAfsauac(Agn)uuacugAfuGfuguggsasu	820	AUCCACACAUCAGUAAUGUAUUC	821
AD-392967	csusauc(Uhd)CfuCfUfUfuacauuuuguL96	822	asCfsaaaa(Tgn)guaaagAfgAfgauagsasa	823	UUCUAUCUCUCUUUACAUUUUGG	824
AD-392968	gsgsucu(Chd)UfaUfAfCfuacauuauuaL96	825	usAfsauaa(Tgn)guaguaUfaGfagaccsasa	826	UUGGUCUCUAUACUACAUUAUUA	827
AD-392969	uscsuau(Ahd)CfuAfCfAfuuauuaauguL96	828	asCfsauua(Agn)uaauguAfgUfauagasgsa	829	UCUCUAUACUACAUUAUUAAUGG	830
AD-392970	gsgsucu(Uhd)CfaAfUfUfaccaagaauuL96	831	asAfsuucu(Tgn)gguaauUfgAfagaccsasg	832	CUGGUCUUCAAUUACCAAGAAUU	833
AD-392971	csasgga(Uhd)AfuGfAfAfguucaucauuL96	834	asAfsugau(Ggn)aacuucAfuAfuccugsasg	835	CUCAGGAUAUGAAGUUCAUCAUC	836
AD-392972	ascsaca(Uhd)CfaGfUfAfauguauucuaL96	837	usAfsgaau(Agn)cauuacUfgAfugugusgsg	838	CCACACAUCAGUAAUGUAUUCUA	839
AD-392973	csusaua(Chd)UfaCfAfUfuauuaaugguL96	840	asCfscauu(Agn)auaaugUfaGfuauagsasg	841	CUCUAUACUACAUUAUUAAUGGG	842
AD-392974	cscscgu(Uhd)UfuAfUfGfauuuacucauL96	843	asUfsgagu(Agn)aaucauAfaAfacgggsusu	844	AACCCGUUUUAUGAUUUACUCAU	845
AD-392975	ususcca(Uhd)GfaCfUfGfcauuuuacuuL96	846	asAfsguaa(Agn)augcagUfcAfuggaasasa	847	UUUUCCAUGACUGCAUUUUACUG	848
AD-392976	uscsuuc(Ahd)AfuUfAfCfcaagaauucuL96	849	asGfsaauu(Cgn)uugguaAfuUfgaagascsc	850	GGUCUUCAAUUACCAAGAAUUCU	851
AD-392977	csusgaa(Ghd)UfuUfCfAfuuuaugauauL96	852	asUfsauca(Tgn)aaaugaAfaCfuucagsasc	853	GUCUGAAGUUUCAUUUAUGAUAC	854

Таблица 2B. Модифицированные последовательности APP человека, без линкера «L96»

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392699	gsasccc(Ahd)AfuUfAfAfguccuacuuu	33	asAfsagua(Ggn)gacuuaAfuUfgggucsasc	34	GUGACCCAAUUAAGUCCUACUUU	35
AD-392700	uscsucc(Uhd)GfaUfUfAfuuuaucacau	36	asUfsguga(Tgn)aaauaaUfcAfggagasgsa	37	UCUCUCCUGAUUAUUUAUCACAU	38
AD-392703	cscsuga(Ahd)CfuUfGfAfauuaauccau	39	asUfsggau(Tgn)aauucaAfgUfucaggscsa	40	UGCCUGAACUUGAAUUAAUCCAC	41

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392704	gsgsuuc(Ahd)AfaCfAfAfaggugcaauu	42	asAfsuugc(Agn)ccuuugUfuUfgaaccscsa	43	UGGGUUCAAACAAAGGUGCAAUC	44
AD-392705	ususuac(Uhd)CfaUfUfAfucgccuuuug	45	csAfsaaag(Ggn)cgauaaUfgAfguaaaasusc	46	GAUUUACUCAUUAUCGCCUUUUG	47
AD-392707	asususua(Ghd)CfuGfUfAfucaaacuagu	48	asCfsuagu(Tgn)ugauacAfgCfuaaaususc	49	GAAUUUAGCUGUAUCAAACUAGU	50
AD-392708	asgsuau(Uhd)CfcUfUfUfccugaucacu	51	asGfsugau(Cgn)aggaaaGfgAfauacususa	52	UAAGUAUUCCUUUCCUGAUCACU	53
AD-392709	gscsuua(Uhd)GfaCfAfUfgaucgcuuuc	54	gsAfsaagc(Ggn)aucaugUfcAfuaagcsasa	55	UUGCUUAUGACAUGAUCGCUUUC	56
AD-392710	asasgau(Ghd)UfgUfCfUfucaauuugua	57	usAfscaaa(Tgn)ugaagaCfaCfaucuusasa	58	UUAAGAUGUGUCUUCAAUUUGUA	59
AD-392711	gscsaaa(Ahd)CfcAfUfUfgcuucacuau	60	asUfsagug(Agn)agcaauGfgUfuuugcsusg	61	CAGCAAAACCAUUGCUUCACUAC	62
AD-392712	asususua(Chd)UfcAfUfUfaucgccuuuu	63	asAfsaagg(Cgn)gauaauGfaGfuaaaauscsa	64	UGAUUUACUCAUUAUCGCCUUUU	65
AD-392713	usascuc(Ahd)UfuAfUfCfgccuuuugau	66	asUfscaaa(Agn)ggcgauAfaUfgaguasasa	67	UUUACUCAUUAUCGCCUUUUGAC	68
AD-392714	usgsccu(Ghd)AfaCfUfUfgaauuaaucu	69	asGfsauua(Agn)uucaagUfuCfaggcasusc	70	GAUGCCUGAACUUGAAUUAAUCC	71
AD-392715	csusgaa(Chd)UfuGfAfAfuuaauccaca	72	usGfsugga(Tgn)uaauucAfaGfuucagsgsc	73	GCCUGAACUUGAAUUAAUCCACA	74
AD-392716	ususuag(Chd)UfgUfAfUfcaaacuaguu	75	asAfscuag(Tgn)uugauaCfaGfcuaaasusu	76	AAUUUAGCUGUAUCAAACUAGUG	77
AD-392717	gsasaua(Ghd)AfuUfCfUfcuccugauua	78	usAfsauca(Ggn)gagagaAfuCfuauucsasu	79	AUGAAUAGAUUCUCUCCUGAUUA	80
AD-392718	uscscug(Ahd)UfuAfUfUfuaucacauau	81	asUfsaugu(Ggn)auaaauAfaUfcaggasgsa	82	UCUCCUGAUUAUUUAUCACAUAG	83
AD-392719	cscscaa(Uhd)UfaAfGfUfccuacuuuau	84	asUfsaaag(Tgn)aggacuUfaAfuugggsusc	85	GACCCAAUUAAGUCCUACUUUAC	86
AD-392720	csasuau(Ghd)CfuUfUfAfagaaucgauu	87	asAfsucga(Tgn)ucuuaaAfgCfauaugsusa	88	UACAUAUGCUUUAAGAAUCGAUG	89
AD-392721	csusucu(Chd)UfuGfCfCfuaaguauucu	90	asGfsaaua(Cgn)uuaggcAfaGfagaagscsa	91	UGCUUCUCUUGCCUAAGUAUUCC	92
AD-392722	csasuug(Chd)UfuAfUfGfacaugaucgu	93	asCfsgauc(Agn)ugucauAfaGfcaaugsasu	94	AUCAUUGCUUAUGACAUGAUCGC	95
AD-392723	csusuau(Ghd)AfcAfUfGfaucgcuuucu	96	asGfsaaag(Cgn)gaucauGfuCfauaagscsa	97	UGCUUAUGACAUGAUCGCUUUCU	98
AD-392724	usasuga(Chd)AfuGfAfUfcgcuuucuau	99	asUfsagaa(Agn)gcgaucAfuGfucauasasg	100	CUUAUGACAUGAUCGCUUUCUAC	101
AD-392725	usgsaca(Uhd)GfaUfCfGfcuuucuacau	102	asUfsguag(Agn)aagcgaUfcAfugucasusa	103	UAUGACAUGAUCGCUUUCUACAC	104
AD-392726	gsasucg(Chd)UfuUfCfUfacacuguauu	105	asAfsuaca(Ggn)uguagaAfaGfcgaucsasu	106	AUGAUCGCUUUCUACACUGUAUU	107
AD-392727	asasaac(Uhd)AfuUfCfAfgaugacgucu	108	asGfsacgu(Cgn)aucugaAfuAfguuuusgsc	109	GCAAAACUAUUCAGAUGACGUCU	110
AD-392728	asasacu(Ahd)UfuCfAfGfaugacgucuu	111	asAfsgacg(Tgn)caucugAfaUfaguuususg	112	CAAAACUAUUCAGAUGACGUCUU	113
AD-392729	ascsgaa(Ahd)AfuCfCfAfaccuacaagu	114	asCfsuugu(Agn)gguuggAfuUfuucgusasg	115	CUACGAAAAUCCAACCUACAAGU	116
AD-392730	usgscuu(Chd)UfcUfUfGfccuaaguauu	117	asAfsuacu(Tgn)aggcaaGfaGfaagcasgsc	118	GCUGCUUCUCUUGCCUAAGUAUU	119

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392731	usgscuu(Ahd)UfgAfCfAfugaucgcuuu	120	asAfsagcg(Agn)ucauguCfaUfaagcasasu	121	AUUGCUUAUGACAUGAUCGCUUU	122
AD-392732	usgsauc(Ghd)CfuUfUfCfuacacuguau	123	asUfsacag(Tgn)guagaaAfgCfgaucasusg	124	CAUGAUCGCUUUCUACACUGUAU	125
AD-392733	asuscgc(Uhd)UfuCfUfAfcacuguauua	126	usAfsauac(Agn)guguagAfaAfgcgauscsa	127	UGAUCGCUUUCUACACUGUAUUA	128
AD-392734	uscsuuu(Ghd)AfcCfGfAfaacgaaaacu	129	asGfsuuuu(Cgn)guuucgGfuCfaaagasusg	130	CAUCUUUGACCGAAACGAAAACC	131
AD-392735	gsusucu(Ghd)GfgUfUfGfacaaauauca	132	usGfsauau(Tgn)ugucaaCfcCfagaacscsu	133	AGGUUCUGGGUUGACAAAUAUCA	134
AD-392736	usgsggu(Uhd)GfaCfAfAfauaucaagau	135	asUfscuug(Agn)uauuugUfcAfacccasgsa	136	UCUGGGUUGACAAAUAUCAAGAC	137
AD-392737	gsasuuu(Ahd)CfuCfAfUfuaucgccuuu	138	asAfsaggc(Ggn)auaaugAfgUfaaaucsasu	139	AUGAUUUACUCAUUAUCGCCUUU	140
AD-392738	uscscuu(Uhd)CfcUfGfAfucacuaugca	141	usGfscaua(Ggn)ugaucaGfgAfaaggasasu	142	AUUCCUUUCCUGAUCACUAUGCA	143
AD-392739	csusuuc(Chd)UfgAfUfCfacuaugcauu	144	asAfsugca(Tgn)agugauCfaGfgaaagsgsa	145	UCCUUUCCUGAUCACUAUGCAUU	146
AD-392740	asusugc(Uhd)UfaUfGfAfcaugaucgcu	147	asGfscgau(Cgn)augucaUfaAfgcaausgsa	148	UCAUUGCUUAUGACAUGAUCGCU	149
AD-392741	uscsuuu(Ahd)AfcCfAfGfucugaaguuu	150	asAfsacuu(Cgn)agacugGfuUfaaagasasa	151	UUUCUUUAACCAGUCUGAAGUUU	152
AD-392742	gsgsauc(Ahd)GfuUfAfCfggaaacgauu	153	asAfsucgu(Tgn)uccguaAfcUfgauccsusu	154	AAGGAUCAGUUACGGAAACGAUG	155
AD-392743	csusggg(Uhd)UfgAfCfAfaauaucaaga	156	usCfsuuga(Tgn)auuuguCfaAfcccagsasa	157	UUCUGGGUUGACAAAUAUCAAGA	158
AD-392744	asusgau(Uhd)UfaCfUfCfauuaucgccu	159	asGfsgcga(Tgn)aaugagUfaAfaucausasa	160	UUAUGAUUUACUCAUUAUCGCCU	161
AD-392745	csusugu(Ghd)GfuUfUfGfugacccaauu	162	asAfsuugg(Ggn)ucacaaAfcCfacaagsasa	163	UUCUUGUGGUUUGUGACCCAAUU	164
AD-392746	asusaug(Chd)UfuUfAfAfgaaucgaugu	165	asCfsaucg(Agn)uucuuaAfaGfcauausgsu	166	ACAUAUGCUUUAAGAAUCGAUGG	167
AD-392747	ususugu(Chd)CfaCfGfUfaucuuugggu	168	asCfsccaa(Agn)gauacgUfgGfacaaasasa	169	UUUUUGUCCACGUAUCUUUGGGU	170
AD-392748	uscsauu(Ghd)UfaAfGfCfacuuuuacgu	171	asCfsguaa(Agn)agugcuUfaCfaaugasasc	172	GUUCAUUGUAAGCACUUUUACGG	173
AD-392749	gsgscca(Ahd)CfaUfGfAfuuagugaacu	174	asGfsuuca(Cgn)uaaucaUfgUfuggccsasa	175	UUGGCCAACAUGAUUAGUGAACC	176
AD-392750	gsasuca(Ghd)UfuAfCfGfgaaacgaugu	177	asCfsaucg(Tgn)uuccguAfaCfugaucscsu	178	AGGAUCAGUUACGGAAACGAUGC	179
AD-392751	usascgg(Ahd)AfaCfGfAfugcucucauu	180	asAfsugag(Agn)gcaucgUfuUfccguasasc	181	GUUACGGAAACGAUGCUCUCAUG	182
AD-392752	usgsauu(Uhd)AfcUfCfAfuuaucgccuu	183	asAfsggcg(Agn)uaaugaGfuAfaaucasusa	184	UAUGAUUUACUCAUUAUCGCCUU	185
AD-392753	gsusaga(Uhd)GfcCfUfGfaacuugaauu	186	asAfsuuca(Agn)guucagGfcAfucuacsusu	187	AAGUAGAUGCCUGAACUUGAAUU	188
AD-392754	ususgua(Uhd)AfuUfAfUfucuugugguu	189	asAfsccac(Agn)agaauaAfuAfuacaascsu	190	AGUUGUAUAUUAUUCUUGUGGUU	191
AD-392755	asusugc(Uhd)GfcUfUfCfugcuauauuu	192	asAfsauau(Agn)gcagaaGfcAfgcaauscsu	193	AGAUUGCUGCUUCUGCUAUAUUU	194
AD-392756	usgscua(Uhd)AfuUfUfGfugauauagga	195	usCfscuau(Agn)ucacaaAfuAfuagcasgsa	196	UCUGCUAUAUUUGUGAUAUAGGA	197

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392757	ascsaca(Uhd)UfaGfGfCfauugagacuu	198	asAfsgucu(Cgn)aaugccUfaAfugugusgsc	199	GCACACAUUAGGCAUUGAGACUU	200
AD-392758	asasgaa(Uhd)CfcCfUfGfuucauuguaa	201	usUfsacaa(Tgn)gaacagGfgAfuucuususu	202	AAAAGAAUCCCUGUUCAUUGUAA	203
AD-392759	csasuug(Uhd)AfaGfCfAfcuuuuacggu	204	asCfscgua(Agn)aagugcUfuAfcaaugsasa	205	UUCAUUGUAAGCACUUUUACGGG	206
AD-392760	ususgcu(Uhd)AfuGfAfCfaugaucgcuu	207	asAfsgcga(Tgn)caugucAfuAfagcaasusg	208	CAUUGCUUAUGACAUGAUCGCUU	209
AD-392761	csasagg(Ahd)UfcAfGfUfuacggaaacu	210	asGfsuuuc(Cgn)guaacuGfaUfccuugsgsu	211	ACCAAGGAUCAGUUACGGAAACG	212
AD-392762	asgsguu(Chd)UfgGfGfUfugacaaauau	213	asUfsauuu(Ggn)ucaaccCfaGfaaccusgsg	214	CCAGGUUCUGGGUUGACAAAUAU	215
AD-392763	asasgau(Ghd)UfgGfGfUfucaaacaaau	216	asUfsuugu(Tgn)ugaaccCfaCfaucuuscsu	217	AGAAGAUGUGGGUUCAAACAAAG	218
AD-392764	csusgaa(Ghd)AfaGfAfAfacaguacaca	219	usGfsugua(Cgn)uguuucUfuCfuucagscsa	220	UGCUGAAGAAGAAACAGUACACA	221
AD-392765	asasguu(Ghd)GfaCfAfGfcaaaaccauu	222	asAfsuggu(Tgn)uugcugUfcCfaacuuscsa	223	UGAAGUUGGACAGCAAAACCAUU	224
AD-392766	asuscgg(Uhd)GfuCfCfAfuuuauagaau	225	asUfsucua(Tgn)aaauggAfcAfccgausgsg	226	CCAUCGGUGUCCAUUUAUAGAAU	227
AD-392767	uscsggu(Ghd)UfcCfAfUfuuauagaaua	228	usAfsuucu(Agn)uaaaugGfaCfaccgasusg	229	CAUCGGUGUCCAUUUAUAGAAUA	230
AD-392768	gscsugu(Ahd)AfcAfCfAfaguagaugcu	231	asGfscauc(Tgn)acuuguGfuUfacagcsasc	232	GUGCUGUAACACAAGUAGAUGCC	233
AD-392769	asasgua(Ghd)AfuGfCfCfugaacuugaa	234	usUfscaag(Tgn)ucaggcAfuCfuacuusgsu	235	ACAAGUAGAUGCCUGAACUUGAA	236
AD-392770	ususgug(Ghd)UfuUfGfUfgacccaauua	237	usAfsauug(Ggn)gucacaAfaCfcacaasgsa	238	UCUUGUGGUUUGUGACCCAAUUA	239
AD-392771	gsusuug(Uhd)GfaCfCfCfaauuaagucu	240	asGfsacuu(Agn)auugggUfcAfcaaacscsa	241	UGGUUUGUGACCCAAUUAAGUCC	242
AD-392772	gsusgac(Chd)CfaAfUfUfaaguccuacu	243	asGfsuagg(Agn)cuuaauUfgGfgucacsasa	244	UUGUGACCCAAUUAAGUCCUACU	245
AD-392773	usasugc(Uhd)UfuAfAfGfaaucgauggu	246	asCfscauc(Ggn)auucuuAfaAfgcauasusg	247	CAUAUGCUUUAAGAAUCGAUGGG	248
AD-392774	ususugu(Ghd)AfuAfUfAfggaauuaaga	249	usCfsuuaa(Tgn)uccuauAfuCfacaaasusa	250	UAUUUGUGAUAUAGGAAUUAAGA	251
AD-392775	asasaga(Ahd)UfcCfCfUfguucauugua	252	usAfscaau(Ggn)aacaggGfaUfucuuususc	253	GAAAAGAAUCCCUGUUCAUUGUA	254
AD-392776	usgsauu(Ghd)UfaCfAfGfaaucauugcu	255	asGfscaau(Ggn)auucugUfaCfaaucasusc	256	GAUGAUUGUACAGAAUCAUUGCU	257
AD-392777	usgsccu(Ghd)GfaCfAfAfacccuucuuu	258	asAfsagaa(Ggn)gguuugUfcCfaggcasusg	259	CAUGCCUGGACAAACCCUUCUUU	260
AD-392778	gsasgca(Ahd)AfaCfUfAfuucagaugau	261	asUfscauc(Tgn)gaauagUfuUfugcucsusu	262	AAGAGCAAAACUAUUCAGAUGAC	263
AD-392779	asgsuga(Ahd)CfcAfAfGfgaucaguuau	264	asUfsaacu(Ggn)auccuuGfgUfucacusasa	265	UUAGUGAACCAAGGAUCAGUUAC	266
AD-392780	usgsaac(Chd)AfaGfGfAfucaguuacgu	267	asCfsguaa(Cgn)ugauccUfuGfguucascsu	268	AGUGAACCAAGGAUCAGUUACGG	269
AD-392781	csasguu(Ahd)CfgGfAfAfacgaugcucu	270	asGfsagca(Tgn)cguuucCfgUfaacugsasu	271	AUCAGUUACGGAAACGAUGCUCU	272
AD-392782	asgsaag(Ahd)UfgUfGfGfguucaaacaa	273	usUfsguuu(Ggn)aacccaCfaUfcuucusgsc	274	GCAGAAGAUGUGGGUUCAAACAA	275

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392783	cscsucu(Ghd)AfaGfUfUfggacagcaaa	276	usUfsugcu(Ggn)uccaacUfuCfagaggscsu	277	AGCCUCUGAAGUUGGACAGCAAA	278
AD-392784	ususaug(Ahd)UfuUfAfCfucauuaucgu	279	asCfsgaua(Agn)ugaguaAfaUfcauaasasa	280	UUUUAUGAUUUACUCAUUAUCGC	281
AD-392785	ascsagc(Uhd)GfuGfCfUfguaacacaau	282	asUfsugug(Tgn)uacagcAfcAfgcuguscsa	283	UGACAGCUGUGCUGUAACACAAG	284
AD-392786	usgsuga(Chd)CfcAfAfUfuaaguccuau	285	asUfsagga(Cgn)uuaauuGfgGfucacasasa	286	UUUGUGACCCAAUUAAGUCCUAC	287
AD-392787	usascau(Ahd)UfgCfUfUfuaagaaucga	288	usCfsgauu(Cgn)uuaaagCfaUfauguasasa	289	UUUACAUAUGCUUUAAGAAUCGA	290
AD-392788	gsusaaa(Uhd)AfaAfUfAfcauucuugga	291	usCfscaag(Agn)auguauUfuAfuuuacsasu	292	AUGUAAAUAAAUACAUUCUUGGA	293
AD-392789	uscsagu(Uhd)AfcGfGfAfaacgaugcuu	294	asAfsgcau(Cgn)guuuccGfuAfacugasusc	295	GAUCAGUUACGGAAACGAUGCUC	296
AD-392790	csusucc(Chd)GfuGfAfAfuggagaguuu	297	asAfsacuc(Tgn)ccauucAfcGfggaagsgsa	298	UCCUUCCCGUGAAUGGAGAGUUC	299
AD-392791	asgsuug(Ghd)AfcAfGfCfaaaaccauuu	300	asAfsaugg(Tgn)uuugcuGfuCfcaacususc	301	GAAGUUGGACAGCAAAACCAUUG	302
AD-392792	cscscau(Chd)GfgUfGfUfccauuuauau	303	asUfsauaa(Agn)uggacaCfcGfaugggsusa	304	UACCCAUCGGUGUCCAUUUAUAG	305
AD-392793	usgscac(Ahd)CfaUfUfAfggcauugaga	306	usCfsucaa(Tgn)gccuaaUfgUfgugcascsa	307	UGUGCACACAUUAGGCAUUGAGA	308
AD-392794	cscsaac(Ahd)UfgAfUfUfagugaaccaa	309	usUfsgguu(Cgn)acuaauCfaUfguugggcsc	310	GGCCAACAUGAUUAGUGAACCAA	311
AD-392795	asusgau(Uhd)AfgUfGfAfaccaaggauu	312	asAfsuccu(Tgn)gguucaCfuAfaucausgsu	313	ACAUGAUUAGUGAACCAAGGAUC	314
AD-392796	ususagu(Ghd)AfaCfCfAfaggaucaguu	315	asAfscuga(Tgn)ccuuggUfuCfacuaasusc	316	GAUUAGUGAACCAAGGAUCAGUU	317
AD-392797	asascca(Ahd)GfgAfUfCfaguuacggaa	318	usUfsccgu(Agn)acugauCfcUfugguuscsa	319	UGAACCAAGGAUCAGUUACGGAA	320
AD-392798	gsusuac(Ghd)GfaAfAfCfgaugcucuca	321	usGfsagag(Cgn)aucguuUfcCfguaacsusg	322	CAGUUACGGAAACGAUGCUCUCA	323
AD-392799	gsasugc(Ahd)GfaAfUfUfccgacaugau	324	asUfscaug(Tgn)cggaauUfcUfgcaucscsa	325	UGGAUGCAGAAUUCCGACAUGAC	326
AD-392800	ususgga(Chd)AfgCfAfAfaaccauugcu	327	asGfscaau(Ggn)guuuugCfuGfuccaascsu	328	AGUUGGACAGCAAAACCAUUGCU	329
AD-392801	asasacc(Ahd)UfuGfCfUfucacuaccca	330	usGfsggua(Ggn)ugaagcAfaUfgguuususg	331	CAAAACCAUUGCUUCACUACCCA	332
AD-392802	cscsauc(Ghd)GfuGfUfCfcauuuauaga	333	usCfsuaua(Agn)auggacAfcCfgauggsgsu	334	ACCCAUCGGUGUCCAUUUAUAGA	335
AD-392803	ususauc(Ghd)CfcUfUfUfugacagcugu	336	asCfsagcu(Ggn)ucaaaaGfgCfgauaasusg	337	CAUUAUCGCCUUUUGACAGCUGU	338
AD-392804	asusegc(Chd)UfuUfUfGfacagcugugu	339	asCfsacag(Cgn)ugucaaAfaGfgcgausasa	340	UUAUCGCCUUUUGACAGCUGUGC	341
AD-392805	ascsaca(Ahd)GfuAfGfAfugccugaacu	342	asGfsuuca(Ggn)gcaucuAfcUfugugususa	343	UAACACAAGUAGAUGCCUGAACU	344
AD-392806	usgsugg(Uhd)UfuGfUfGfacccaauuaa	345	usUfsaauu(Ggn)ggucacAfaAfccacasasg	346	CUUGUGGUUUGUGACCCAAUUAA	347
AD-392807	gsgsgau(Ghd)CfuUfCfAfugugaacguu	348	asAfscguu(Cgn)acaugaAfgCfaucccscsc	349	GGGGGAUGCUUCAUGUGAACGUG	350
AD-392808	usgsugc(Ahd)CfaCfAfUfuaggcauuga	351	usCfsaaug(Cgn)cuaaugUfgUfgcacasusa	352	UAUGUGCACACAUUAGGCAUUGA	353

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392809	asasaug(Ghd)AfaGfUfGfgcaauauaau	354	asUfsuaua(Tgn)ugccacUfuCfcauuususc	355	GAAAAUGGAAGUGGCAAUAUAAG	356
AD-392810	asusgga(Ahd)GfuGfGfCfaauauaaggu	357	asCfscuua(Tgn)auugccAfcUfuccaususu	358	AAAUGGAAGUGGCAAUAUAAGGG	359
AD-392811	usgsccc(Ghd)AfgAfUfCfcuguuaaacu	360	asGfsuuua(Agn)caggauCfuCfgggcasasg	361	CUUGCCCGAGAUCCUGUUAAACU	362
AD-392812	asusuag(Uhd)GfaAfCfCfaaggaucagu	363	asCfsugau(Cgn)cuugguUfcAfcuaauscsa	364	UGAUUAGUGAACCAAGGAUCAGU	365
AD-392813	gsasacc(Ahd)AfgGfAfUfcaguuacgga	366	usCfscgua(Agn)cugaucCfuUfgguucsasc	367	GUGAACCAAGGAUCAGUUACGGA	368
AD-392814	asasgga(Uhd)CfaGfUfUfacggaaacga	369	usCfsguuu(Cgn)cguaacUfgAfuccuusgsg	370	CCAAGGAUCAGUUACGGAAACGA	371
AD-392815	csasaca(Chd)AfgAfAfAfacgaaguuga	372	usCfsaacu(Tgn)cguuuuCfuGfuguugsgsc	373	GCCAACACAGAAAACGAAGUUGA	374
AD-392816	usgsggu(Uhd)CfaAfAfCfaaaggugcaa	375	usUfsgcac(Cgn)uuuguuUfgAfacccascsa	376	UGUGGGUUCAAACAAAGGUGCAA	377
AD-392817	csasgug(Ahd)UfcGfUfCfaucaccuugu	378	asCfsaagg(Tgn)gaugacGfaUfcacugsusc	379	GACAGUGAUCGUCAUCACCUUGG	380
AD-392818	ascscca(Uhd)CfgGfUfGfuccauuuaua	381	usAfsuaaa(Tgn)ggacacCfgAfugggusasg	382	CUACCCAUCGGUGUCCAUUUAUA	383
AD-392819	uscsuug(Uhd)GfgUfUfUfgugacccaau	384	asUfsuggg(Tgn)cacaaaCfcAfcaagasasu	385	AUUCUUGUGGUUUGUGACCCAAU	386
AD-392820	ususugu(Ghd)AfcCfCfAfauuaaguccu	387	asGfsgacu(Tgn)aauuggGfuCfacaaascsc	388	GGUUUGUGACCCAAUUAAGUCCU	389
AD-392821	ususgug(Ahd)CfcCfAfAfuuaaguccua	390	usAfsggac(Tgn)uaauugGfgUfcacaasasc	391	GUUUGUGACCCAAUUAAGUCCUA	392
AD-392822	ususcag(Ahd)UfgAfCfGfucuuggccaa	393	usUfsggcc(Agn)agacguCfaUfcugaasusa	394	UAUUCAGAUGACGUCUUGGCCAA	395
AD-392823	asuscag(Uhd)UfaCfGfGfaaacgaugcu	396	asGfscauc(Ggn)uuuccgUfaAfcugauscsc	397	GGAUCAGUUACGGAAACGAUGCU	398
AD-392824	usgsgau(Ghd)CfaGfAfAfuuccgacauu	399	asAfsuguc(Ggn)gaauucUfgCfauccasusc	400	GAUGGAUGCAGAAUUCCGACAUG	401
AD-392825	gsuscca(Ahd)GfaUfGfCfagcagaacgu	402	asCfsguuc(Tgn)gcugcaUfcUfuggacsasg	403	CUGUCCAAGAUGCAGCAGAACGG	404
AD-392826	usasccc(Ahd)UfcGfGfUfgucccauuuau	405	asUfsaaau(Ggn)gacaccGfaUfggguasgsu	406	ACUACCCAUCGGUGUCCAUUUAU	407
AD-392827	ususuug(Ahd)CfaGfCfUfgugcuguaau	408	asUfsuaca(Ggn)cacagcUfgUfcaaaasgsg	409	CCUUUUGACAGCUGUGCUGUAAC	410
AD-392828	ususgac(Ahd)GfcUfGfUfgcuguaacau	411	asUfsguua(Cgn)agcacaGfcUfgucaasasa	412	UUUUGACAGCUGUGCUGUAACAC	413
AD-392829	asgscug(Uhd)GfcUfGfUfaacacaagua	414	usAfscuug(Tgn)guuacaGfcAfcagcusgsu	415	ACAGCUGUGCUGUAACACAAGUA	416
AD-392830	gsusuuu(Ahd)UfgUfGfCfacacauuagu	417	asCfsuaau(Ggn)ugugcaCfaUfaaaacsasg	418	CUGUUUUAUGUGCACACAUUAGG	419
AD-392831	ususcaa(Uhd)UfaCfCfAfagaauucucu	420	asGfsagaa(Tgn)ucuuggUfaAfuugaasgsa	421	UCUUCAAUUACCAAGAAUUCUCC	422
AD-392832	csascac(Ahd)UfcAfGfUfaauguauucu	423	asGfsaaua(Cgn)auuacuGfaUfgugugsgsa	424	UCCACACAUCAGUAAUGUAUUCU	425
AD-392833	usgsguc(Uhd)CfuAfUfAfcuacauuauu	426	asAfsuaau(Ggn)uaguauAfgAfgaccasasa	427	UUUGGUCUCUAUACUACAUUAUU	428
AD-392834	ascsccg(Uhd)UfuUfAfUfgauuuacuca	429	usGfsagua(Agn)aucauaAfaAfcgggususu	430	AAACCCGUUUUAUGAUUUACUCA	431

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392835	usascga(Ahd)AfaUfCfCfaaccuacaau	432	asUfsugua(Ggn)guuggaUfuUfucguasgsc	433	GCUACGAAAAUCCAACCUACAAG	434
AD-392836	uscscac(Ahd)CfaUfCfCfAfguaauguauu	435	asAfsuaca(Tgn)uacugaUfgUfguggasusu	436	AAUCCACACAUCAGUAAUGUAUU	437
AD-392837	csusggu(Chd)UfuCfAfAfuuaccaagaa	438	usUfscuug(Ggn)uaauugAfaGfaccagscsa	439	UGCUGGUCUUCAAUUACCAAGAA	440
AD-392838	gscscau(Chd)UfuUfCfAfccgaaacgaa	441	usUfscguu(Tgn)cggucaAfaGfauggcsasu	442	AUGCCAUCUUUGACCGAAACGAA	443
AD-392839	cscsauc(Uhd)UfuGfAfCfcgaaacgaaa	444	usUfsucgu(Tgn)ucggucAfaAfgauggscsa	445	UGCCAUCUUUGACCGAAACGAAA	446
AD-392840	csusacg(Ahd)AfaAfUfCfcaaccuacaa	447	usUfsguag(Ggn)uuggauUfuUfcguagscsc	448	GGCUACGAAAAUCCAACCUACAA	449
AD-392841	asuscca(Chd)AfcAfUfCfaguaauguau	450	asUfsacau(Tgn)acugauGfuGfuggaususa	451	UAAUCCACACAUCAGUAAUGUAU	452
AD-392842	csasugc(Chd)AfuCfUfUfugaccgaaau	453	asUfsuucg(Ggn)ucaaagAfuGfgcaugsasg	454	CUCAUGCCAUCUUUGACCGAAAC	455
AD-392843	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuau	456	asUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	457	ACGGCUACGAAAAUCCAACCUAC	458
AD-392844	uscsaug(Chd)CfaUfCfUfuugaccgaaa	459	usUfsucgg(Tgn)caaagaUfgGfcaugasgsa	460	UCUCAUGCCAUCUUUGACCGAAA	461
AD-392845	csasgua(Chd)AfcAfUfCfcauucaucau	462	asUfsgaug(Agn)auggauGfuGfuacugsusu	463	AACAGUACACAUCCAUUCAUCAU	464
AD-392846	asascgg(Chd)UfaCfGfAfaaauccaacu	465	asGfsuugg(Agn)uuuucgUfaGfccguuscsu	466	AGAACGGCUACGAAAAUCCAACC	467
AD-392847	gsasagu(Uhd)UfcAfUfUfuaugauacaa	468	usUfsguau(Cgn)auaaaauGfaAfacuucsasg	469	CUGAAGUUUCAUUUAUGAUACAA	470
AD-392848	asusgcc(Ahd)UfcUfUfUfgaccgaaacu	471	asGfsuuuc(Ggn)gucaaaGfaUfggcausgsa	472	UCAUGCCAUCUUUGACCGAAACG	473
AD-392849	gsasacg(Ghd)CfuAfCfCfgaaaauccaau	474	asUfsugga(Tgn)uuucguAfgCfcguucsusg	475	CAGAACGGCUACGAAAAUCCAAC	476
AD-392850	uscsuuc(Ghd)UfgCfCfUfguuuuauguu	477	asAfscaua(Agn)aacaggCfaCfgaagasasa	478	UUUCUUCGUGCCUGUUUUAUGUG	479
AD-392851	ususgcc(Chd)GfaGfAfUfccuguuaaau	480	asUfsuuaa(Cgn)aggaucUfcGfggcaasgsa	481	UCUUGCCCGAGAUCCUGUUAAAC	482
AD-392852	csusucg(Uhd)GfcCfUfGfuuuuaugugu	483	asCfsacau(Agn)aaacagGfcAfcgaagsasa	484	UUCUUCGUGCCUGUUUUAUGUGC	485
AD-392853	gscsgcc(Ahd)UfgUfCfCfcaaaguuuau	486	asUfsaaac(Tgn)uuugggaCfaUfggcgcsusg	487	CAGCGCCAUGUCCCAAAGUUUAC	488
AD-392854	gsuscau(Ahd)GfcGfAfCfagugaucguu	489	asAfscgau(Cgn)acugucGfcUfaugacsasa	490	UUGUCAUAGCGACAGUGAUCGUC	491
AD-392855	gscsuac(Ghd)AfaAfAfUfccaaccuaca	492	usGfsuagg(Tgn)uggauuUfuCfguagcscsg	493	CGGCUACGAAAAUCCAACCUACA	494
AD-392856	asusagc(Ghd)AfcAfGfUfgaucgucauu	495	asAfsugac(Ggn)aucacuGfuCfgcuausgsa	496	UCAUAGCGACAGUGAUCGUCAUC	497
AD-392857	csusugc(Chd)CfgAfGfAfuccuguuaaa	498	usUfsuaac(Agn)ggaucuCfgGfgcaagsasg	499	CUCUUGCCCGAGAUCCUGUUAAA	500
AD-392858	csuscau(Ghd)CfcAfUfCfuuugaccgaa	501	usUfscggu(Cgn)aaagauGfgCfaugagsasg	502	CUCUCAUGCCAUCUUUGACCGAA	503
AD-392859	ascsggc(Uhd)AfcGfAfAfaauccaaccu	504	asGfsguug(Ggn)auuuucGfuAfgccgususc	505	GAACGGCUACGAAAAUCCAACCU	506
AD-392860	csasuca(Ahd)AfaAfUfUfgguguucuuu	507	asAfsagaa(Cgn)accaauUfuUfugaugsasu	508	AUCAUCAAAAAUUGGUGUUCUUU	509

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392861	asuscca(Ahd)CfcUfAfCfaaguucuuug	510	csAfsaaga(Agn)cuuguaGfgUfuggaususu	511	AAAUCCAACCUACAAGUUCUUUG	512
AD-392862	csgscuu(Uhd)CfuAfCfAfcuguauuaca	513	usGfsuaau(Agn)caguguAfgAfaagcgsasu	514	AUCGCUUUCUACACUGUAUUACA	515
AD-392863	uscscaa(Chd)CfuAfCfAfaguucuuuga	516	usCfsaaag(Agn)acuuguAfgGfuuggasusu	517	AAUCCAACCUACAAGUUCUUUGA	518
AD-392864	uscsucu(Chd)UfuUfAfCfauuuuggucu	519	asGfsacca(Agn)aauguaAfaGfagagasusa	520	UAUCUCUCUUUACAUUUUGGUCU	521
AD-392865	csuscuc(Uhd)UfuAfCfAfuuuuggucuu	522	asAfsgacc(Agn)aaauguAfaAfgagagsasu	523	AUCUCUCUUUACAUUUUGGUCUC	524
AD-392866	ususugu(Ghd)UfaCfUfGfuaaagaauuu	525	asAfsauuc(Tgn)uuacagUfaCfacaaasasc	526	GUUUUGUGUACUGUAAAGAAUUU	527
AD-392867	gsusgua(Chd)UfgUfAfAfagaauuuagu	528	asCfsuaaa(Tgn)ucuuuaCfaGfuacacsasa	529	UUGUGUACUGUAAAGAAUUUAGC	530
AD-392868	ascscca(Ahd)UfuAfAfGfuccuacuuua	531	usAfsaagu(Agn)ggacuuAfaUfugggusesa	532	UGACCCAAUUAAGUCCUACUUUA	533
AD-392869	uscscua(Chd)UfuUfAfCfauaugcuuua	534	usAfsaagc(Agn)uauguaAfaGfuaggascsu	535	AGUCCUACUUUACAUAUGCUUUA	536
AD-392870	cscsuac(Uhd)UfuAfCfAfuaugcuuuaa	537	usUfsaaag(Cgn)auauguAfaAfguaggsasc	538	GUCCUACUUUACAUAUGCUUUAA	539
AD-392871	ususcua(Chd)AfcUfGfUfauuacauaaa	540	usUfsuaug(Tgn)aauacaGfuGfuagaasasg	541	CUUUCUACACUGUAUUACAUAAA	542
AD-392872	uscsuac(Ahd)CfuGfUfAfuuacauaaau	543	asUfsuuau(Ggn)uaauacAfgUfguagasasa	544	UUUCUACACUGUAUUACAUAAAU	545
AD-392873	csususuu(Ahd)AfgAfUfGfugucuucaau	546	asUfsugaa(Ggn)acacauCfuUfaaaagsasa	547	UUCUUUUAAGAUGUGUCUUCAAU	548
AD-392874	asusgug(Uhd)CfuUfCfAfauuuguauaa	549	usUfsauac(Agn)aauugaAfgAfcacauscsu	550	AGAUGUGUCUUCAAUUUGUAUAA	551
AD-392875	asuscaa(Ahd)AfaUfUfGfguguucuuug	552	csAfsaaga(Agn)caccaaUfuUfuugausgsa	553	UCAUCAAAAAUUGGUGUUCUUUG	554
AD-392876	asasauc(Chd)AfaCfCfUfacaaguucuu	555	asAfsgaac(Tgn)uguaggUfuGfgauuususc	556	GAAAAUCCAACCUACAAGUUCUU	557
AD-392877	gsusacu(Ghd)UfaAfAfGfaauuuagcuu	558	asAfsgcua(Agn)auucuuUfaCfaguacsasc	559	GUGUACUGUAAAGAAUUUAGCUG	560
AD-392878	csusccu(Ghd)AfuUfAfUfuuaucacaua	561	usAfsugug(Agn)uaaauaAfuCfaggagsasg	562	CUCUCCUGAUUAUUUAUCACAUA	563
AD-392879	gscscag(Uhd)UfgUfAfUfauuauucuuu	564	asAfsagaa(Tgn)aauauaCfaAfcuggcsusa	565	UAGCCAGUUGUAUAUUAUUCUUG	566
AD-392880	asasuua(Ahd)GfuCfCfUfacuuuacaua	567	usAfsugua(Agn)aguaggAfcUfuaauusgsg	568	CCAAUUAAGUCCUACUUUACAUA	569
AD-392881	csusugc(Chd)UfaAfGfUfauuccuuucu	570	asGfsaaag(Ggn)aauacuUfaGfgcaagsasg	571	CUCUUGCCUAAGUAUUCCUUUCC	572
AD-392882	asususcc(Uhd)UfuCfCfUfgaucacuauu	573	asAfsuagu(Ggn)aucaggAfaAfggaausasc	574	GUAUUCCUUUCCUGAUCACUAUG	575
AD-392883	ascsuau(Ghd)CfaUfUfUfuaaaguuaaa	576	usUfsuaac(Tgn)uuaaaaUfgCfauagusgsa	577	UCACUAUGCAUUUUAAAGUUAAA	578
AD-392884	usgsuuc(Ahd)UfuGfUfAfagcacuuuua	579	usAfsaaag(Tgn)gcuuacAfaUfgaacasgsg	580	CCUGUUCAUUGUAAGCACUUUUA	581
AD-392885	asasuua(Chd)CfaAfGfAfauucuccaaa	582	usUfsugga(Ggn)aauucuUfgGfuaauusgsa	583	UCAAUUACCAAGAAUUCUCCAAA	584
AD-392886	ususacc(Ahd)AfgAfAfUfucuccaaaau	585	asUfsuuug(Ggn)agaauuCfuUfgguaasusu	586	AAUUACCAAGAAUUCUCCAAAAC	587

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392887	uscsauu(Ghd)CfuUfAfUfgacaugaucu	588	asGfsauca(Tgn)gucauaAfgCfaaugasusu	589	AAUCAUUGCUUAUGACAUGAUCG	590
AD-392889	ususuua(Ahd)GfaUfGfUfgucuucaauu	591	asAfsuuga(Agn)gacacaUfcUfuaaaasgsa	592	UCUUUUAAGAUGUGUCUUCAAUU	593
AD-392890	asusccu(Ghd)UfuAfAfAfcuuccuacaa	594	usUfsguag(Ggn)aaguuuAfaCfaggauscsu	595	AGAUCCUGUUAAACUUCCUACAA	596
AD-392891	ascsuau(Uhd)CfaGfAfUfgacgucuugu	597	asCfsaaga(Cgn)gucaucUfgAfauagususu	598	AAACUAUUCAGAUGACGUCUUGG	599
AD-392892	gsusuca(Uhd)CfaUfCfAfaaaauugguu	600	asAfsccaa(Tgn)uuuugaUfgAfugaacsusu	601	AAGUUCAUCAUCAAAAAUUGGUG	602
AD-392893	usasucu(Chd)UfcUfUfUfacauuuuggu	603	asCfscaaa(Agn)uguaaaGfaGfagauasgsa	604	UCUAUCUCUCUUUACAUUUUGGU	605
AD-392894	asuscuc(Uhd)CfuUfUfAfcauuuugguu	606	asAfsccaa(Agn)auguaaAfgAfgagausasg	607	CUAUCUCUCUUUACAUUUUGGUC	608
AD-392895	usgsugu(Ahd)CfuGfUfAfaagaauuuau	609	asUfsaaau(Tgn)cuuuacAfgUfacacasasa	610	UUUGUGUACUGUAAAGAAUUUAG	611
AD-392896	csusacu(Uhd)UfaCfAfUfaugcuuuaau	612	asUfsuaaa(Ggn)cauaugUfaAfaguagsgsa	613	UCCUACUUUACAUAUGCUUUAAG	614
AD-392897	usgsccu(Ahd)AfgUfAfUfuccuuuccuu	615	asAfsggaa(Agn)ggaauaCfuUfaggcasasg	616	CUUGCCUAAGUAUUCCUUUCCUG	617
AD-392898	asasgua(Uhd)UfcCfUfUfuccugaucau	618	asUfsgauc(Agn)ggaaagGfaAfuacuusasg	619	CUAAGUAUUCCUUUCCUGAUCAC	620
AD-392899	gsusauu(Chd)CfuUfUfCfcugaucacua	621	usAfsguga(Tgn)caggaaAfgGfaauacsusu	622	AAGUAUUCCUUUCCUGAUCACUA	623
AD-392900	ususccu(Ghd)AfuCfAfCfuaugcauuuu	624	asAfsaaug(Cgn)auagugAfuCfaggaasasg	625	CUUUCCUGAUCACUAUGCAUUUU	626
AD-392901	csusgau(Chd)AfcUfAfUfgcauuuuaaa	627	usUfsuaaa(Agn)ugcauaGfuGfaucagsgsa	628	UCCUGAUCACUAUGCAUUUUAAA	629
AD-392902	csascgu(Ahd)UfcUfUfUfggucuuuga	630	usCfsaaag(Agn)cccaaaGfaUfacgugsgsa	631	UCCACGUAUCUUUGGGUCUUUGA	632
AD-392903	usgsggu(Chd)UfuUfGfAfuaaagaaaau	633	asUfsuuuc(Tgn)uuaucaAfaGfacccasasa	634	UUUGGGUCUUUGAUAAAGAAAAG	635
AD-392904	uscsaau(Uhd)AfcCfAfAfgaauucucca	636	usGfsgaga(Agn)uucuugGfuAfauugasasg	637	CUUCAAUUACCAAGAAUUCUCCA	638
AD-392906	uscsgcu(Uhd)UfcUfAfCfacuguauuau	639	asUfsaaua(Cgn)aguguaGfaAfagcgasusc	640	GAUCGCUUUCUACACUGUAUUAC	641
AD-392907	asusuuu(Chd)UfuUfAfAfccagucugaa	642	usUfscaga(Cgn)ugguuaAfaGfaaaaususg	643	CAAUUUUCUUUAACCAGUCUGAA	644
AD-392908	csusuua(Ahd)CfcAfGfUfcugaaguuuc	645	gsAfsaacu(Tgn)cagacuGfgUfuaaagsasa	646	UUCUUUAACCAGUCUGAAGUUUC	647
AD-392909	usasaga(Uhd)GfuGfUfCfuucaauuugu	648	asCfsaaau(Tgn)gaagacAfcAfucuuasasa	649	UUUAAGAUGUGUCUUCAAUUUGU	650
AD-392910	gsasucc(Uhd)GfuUfAfAfacuuccuaca	651	usGfsuagg(Agn)aguuuaAfcAfggaucsusc	652	GAGAUCCUGUUAAACUUCCUACA	653
AD-392911	csusgcu(Uhd)CfaGfAfAfagagcaaaau	654	asUfsuuug(Cgn)ucuuucUfgAfagcagscsu	655	AGCUGCUUCAGAAAGAGCAAAAC	656
AD-392912	csasgaa(Ahd)GfaGfCfAfaaacuauuca	657	usGfsaaua(Ggn)uuuugcUfcUfuucugsasa	658	UUCAGAAAGAGCAAAACUAUUCA	659
AD-392913	usasuga(Ahd)GfuUfCfAfucaucaaaaa	660	usUfsuuug(Agn)ugaugaAfcUfucauasusc	661	GAUAUGAAGUUCAUCAUCAAAAA	662
AD-392914	csasuca(Uhd)CfaAfAfAfauugguguuu	663	asAfsacac(Cgn)aauuuuUfgAfugaugsasa	664	UUCAUCAUCAAAAAUUGGUGUUC	665

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392915	uscsaaa(Ahd)AfuUfGfGfuguucuuugu	666	asCfsaaag(Agn)acaccaAfuUfuuugasusg	667	CAUCAAAAAUUGGUGUUCUUUGC	668
AD-392916	asasaau(Chd)CfaAfCfCfuacaaguucu	669	asGfsaacu(Tgn)guagguUfgGfauuuuscsg	670	CGAAAAUCCAACCUACAAGUUCU	671
AD-392917	cscsaac(Chd)UfaCfAfAfguucuuugau	672	asUfscaaa(Ggn)aacuugUfaGfguuggsasu	673	AUCCAACCUACAAGUUCUUUGAG	674
AD-392918	ascsuca(Uhd)UfaUfCfGfccuuuugaca	675	usGfsucaa(Agn)aggcgaUfaAfugagusasa	676	UUACUCAUUAUCGCCUUUUGACA	677
AD-392919	csuscau(Uhd)AfuCfGfCfcuuuugacau	678	asUfsguca(Agn)aaggcgAfuAfaugagsusa	679	UACUCAUUAUCGCCUUUUGACAG	680
AD-392920	usgsugc(Uhd)GfuAfAfCfacaaguagau	681	asUfscuac(Tgn)uguguuAfcAfgcacasgsc	682	GCUGUGCUGUAACACAAGUAGAU	683
AD-392921	gsusgcu(Ghd)UfaAfCfAfcaaguagauu	684	asAfsucua(Cgn)uuguguUfaCfagcacsasg	685	CUGUGCUGUAACACAAGUAGAUG	686
AD-392922	uscsuuu(Ahd)CfaUfUfUfuggucucuau	687	asUfsagag(Agn)ccaaaaUfgUfaaagasgsa	688	UCUCUUUACAUUUUGGUCUCUAU	689
AD-392923	asusggg(Uhd)UfuUfGfUfguacuguaaa	690	usUfsuaca(Ggn)uacacaAfaAfcccaususa	691	UAAUGGGUUUUGUGUACUGUAAA	692
AD-392924	ususgug(Uhd)AfcUfGfUfaaagaauuua	693	usAfsaauu(Cgn)uuuacaGfuAfcacaasasa	694	UUUUGUGUACUGUAAAGAAUUUA	695
AD-392925	gscsugu(Ahd)UfcAfAfAfcuagugcauu	696	asAfsugca(Cgn)uaguuuGfaUfacagcsusa	697	UAGCUGUAUCAAACUAGUGCAUG	698
AD-392926	csusagu(Ghd)CfaUfGfAfauagauucuu	699	asAfsgaau(Cgn)uauucaUfgCfacuagsusu	700	AACUAGUGCAUGAAUAGAUUCUC	701
AD-392927	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucu	702	asGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	703	ACUAGUGCAUGAAUAGAUUCUCU	704
AD-392928	csuscuc(Chd)UfgAfUfUfauuuaucaca	705	usGfsugau(Agn)aauaauCfaGfgagagsasa	706	UUCUCUCCUGAUUAUUUAUCACA	707
AD-392929	cscsuga(Uhd)UfaUfUfUfaucacauagu	708	asCfsuaug(Tgn)gauaaaUfaAfucaggsasg	709	CUCCUGAUUAUUUAUCACAUAGC	710
AD-392930	usasagu(Chd)CfuAfCfUfuuacauaugu	711	asCfsauau(Ggn)uaaaguAfgGfacuuasasu	712	AUUAAGUCCUACUUUACAUAUGC	713
AD-392931	asgsucc(Uhd)AfcUfUfUfacauaugcuu	714	asAfsgcau(Agn)uguaaaGfuAfggacususa	715	UAAGUCCUACUUUACAUAUGCUU	716
AD-392932	gsusccu(Ahd)CfuUfUfAfcauaugcuuu	717	asAfsagca(Tgn)auguaaAfgUfaggacsusu	718	AAGUCCUACUUUACAUAUGCUUU	719
AD-392933	ususcuc(Uhd)UfgCfCfUfaaguauuccu	720	asGfsgaau(Agn)cuuaggCfaAfgagaasgsc	721	GCUUCUCUUGCCUAAGUAUUCCU	722
AD-392934	csuscuu(Ghd)CfcUfAfAfguauuccuuu	723	asAfsagga(Agn)uacuuaGfgCfaagagsasa	724	UUCUCUUGCCUAAGUAUUCCUUU	725
AD-392935	usasuuc(Chd)UfuUfCfCfugaucacuau	726	asUfsagug(Agn)ucaggaAfaGfgaauascsu	727	AGUAUUCCUUUCCUGAUCACUAU	728
AD-392936	ususucc(Uhd)GfaUfCfAfcuaugcauuu	729	asAfsaugc(Agn)uagugaUfcAfggaaasgsg	730	CCUUUCCUGAUCACUAUGCAUUU	731
AD-392937	csascua(Uhd)GfcAfUfUfuuaaaguuaa	732	usUfsaacu(Tgn)uaaaauGfcAfuagugsasu	733	AUCACUAUGCAUUUUAAAGUUAA	734
AD-392938	csusgca(Uhd)UfuUfAfCfuguacagauu	735	asAfsucug(Tgn)acaguaAfaAfugcagsusc	736	GACUGCAUUUUACUGUACAGAUU	737
AD-392939	ususcug(Chd)UfaUfAfUfuugugauaua	738	usAfsuauc(Agn)caaauaUfaGfcagaasgsc	739	GCUUCUGCUAUAUUUGUGAUAUA	740
AD-392940	uscsugc(Uhd)AfuAfUfUfugugauauau	741	asUfsauau(Cgn)acaaauAfuAfgcagasasg	742	CUUCUGCUAUAUUUGUGAUAUAG	743

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392941	ascsgua(Uhd)CfuUfUfGfggucuuugau	744	asUfscaaa(Ggn)acccaaAfgAfuacgusgsg	745	CCACGUAUCUUUGGGUCUUUGAU	746
AD-392942	uscsuuu(Ghd)GfgUfCfUfuugauaaaga	747	usCfsuuua(Tgn)caaagaCfcCfaaagasusa	748	UAUCUUUGGGUCUUUGAUAAAGA	749
AD-392943	csusuug(Ghd)GfuCfUfUfugauaaagaa	750	usUfscuuu(Agn)ucaaagAfcCfcaaagsasu	751	AUCUUUGGGUCUUUGAUAAAGAA	752
AD-392944	ususggg(Uhd)CfuUfUfGfauaaagaaaa	753	usUfsuucu(Tgn)uaucaaAfgAfcccaasasg	754	CUUUGGGUCUUUGAUAAAGAAAA	755
AD-392945	asgsaau(Chd)CfcUfGfUfucauuguaau	756	asUfsuaca(Agn)ugaacaGfgGfauucususu	757	AAAGAAUCCCUGUUCAUUGUAAG	758
AD-392946	gsasauc(Chd)CfuGfUfUfcauuguaagu	759	asCfsuuac(Agn)augaacAfgGfgauucsusu	760	AAGAAUCCCUGUUCAUUGUAAGC	761
AD-392947	gsusuca(Uhd)UfgUfAfAfgcacuuuuau	762	asUfsaaaa(Ggn)ugcuuaCfaAfugaacsasg	763	CUGUUCAUUGUAAGCACUUUUAC	764
AD-392948	ususaug(Ahd)CfaUfGfAfucgcuuucua	765	usAfsgaaa(Ggn)cgaucaUfgUfcauaasgsc	766	GCUUAUGACAUGAUCGCUUUCUA	767
AD-392949	asusgac(Ahd)UfgAfUfCfgcuuucuaca	768	usGfsuaga(Agn)agcgauCfaUfgucausasa	769	UUAUGACAUGAUCGCUUUCUACA	770
AD-392950	csasuga(Uhd)CfgCfUfUfucuacacugu	771	asCfsagug(Tgn)agaaagCfgAfucaugsusc	772	GACAUGAUCGCUUUCUACACUGU	773
AD-392951	csusuuc(Uhd)AfcAfCfUfguauuacaua	774	usAfsugua(Agn)uacaguGfuAfgaaagscsg	775	CGCUUUCUACACUGUAUUACAUA	776
AD-392952	gsasuuc(Ahd)AfuUfUfUfcuuuaaccau	777	asUfsgguu(Agn)aagaaaAfuUfgaaucsusg	778	CAGAUUCAAUUUUCUUUAACCAG	779
AD-392953	ususucu(Uhd)UfaAfCfCfagucugaagu	780	asCfsuuca(Ggn)acugguUfaAfagaaasasu	781	AUUUUCUUUAACCAGUCUGAAGU	782
AD-392954	ususuaa(Ghd)AfuGfUfGfucuucaauuu	783	asAfsauug(Agn)agacacAfuCfuuaaasasg	784	CUUUUAAGAUGUGUCUUCAAUUU	785
AD-392955	ususaag(Ahd)UfgUfGfUfcuucaauuug	786	csAfsaauu(Ggn)aagacaCfaUfcuuaasasa	787	UUUUAAGAUGUGUCUUCAAUUUG	788
AD-392956	asgsaug(Uhd)GfuCfUfUfcaauuuguau	789	asUfsacaa(Agn)uugaagAfcAfcaucususa	790	UAAGAUGUGUCUUCAAUUUGUAU	791
AD-392957	usgsucu(Uhd)CfaAfUfUfuguauaaaau	792	asUfsuuua(Tgn)acaaauUfgAfagacascsa	793	UGUGUCUUCAAUUUGUAUAAAAU	794
AD-392958	csusuca(Ahd)UfuUfGfUfauaaaauggu	795	asCfscauu(Tgn)uauacaAfaUfugaagsasc	796	GUCUUCAAUUUGUAUAAAAUGGU	797
AD-392959	asusggu(Ghd)UfuUfUfCfauguaaauaa	798	usUfsauuu(Agn)caugaaAfaCfaccaususu	799	AAAUGGUGUUUUCAUGUAAAUAA	800
AD-392960	ususcuu(Uhd)UfaAfGfAfugugucuuca	801	usGfsaaga(Cgn)acaucuUfaAfaagaasgsg	802	CCUUCUUUUAAGAUGUGUCUUCA	803
AD-392961	usgsuau(Uhd)CfuAfUfCfucucuuuaca	804	usGfsuaaa(Ggn)agagauAfgAfauacasusu	805	AAUGUAUUCUAUCUCUCUUUACA	806
AD-392962	gsuscuc(Uhd)AfuAfCfUfacauuauuaa	807	usUfsaaua(Agn)uguaguAfuAfgagacscsa	808	UGGUCUCUAUACUACAUUAUUAA	809
AD-392963	uscsucu(Ahd)UfaCfUfAfcauuauuaau	810	asUfsuaau(Agn)auguagUfaUfagagascsc	811	GGUCUCUAUACUACAUUAUUAAU	812
AD-392964	csuscua(Uhd)AfcUfAfCfauuauuaauu	813	asAfsuuaa(Tgn)aauguaGfuAfuagagsasc	814	GUCUCUAUACUACAUUAUUAAUG	815
AD-392965	csusuca(Ahd)UfuAfCfCfaagaauucuu	816	asAfsgaau(Tgn)cuugguAfaUfugaagsasc	817	GUCUUCAAUUACCAAGAAUUCUC	818
AD-392966	cscsaca(Chd)AfuCfAfGfuaauguauuu	819	asAfsauac(Agn)uuacugAfuGfuguggsasu	820	AUCCACACAUCAGUAAUGUAUUC	821

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-392967	csusauc(Uhd)CfuCfUfUfuacauuuugu	822	asCfsaaaa(Tgn)guaaagAfgAfgauagsasa	823	UUCUAUCUCUCUUUACAUUUUGG	824
AD-392968	gsgsucu(Chd)UfaUfAfCfuacauuauua	825	usAfsauaa(Tgn)guaguaUfaGfagaccsasa	826	UUGGUCUCUAUACUACAUUAUUA	827
AD-392969	uscsuau(Ahd)CfuAfCfAfuuauuaaugu	828	asCfsauua(Agn)uaauguAfgUfauagasgsa	829	UCUCUAUACUACAUUAUUAAUGG	830
AD-392970	gsgsucu(Uhd)CfaAfUfUfaccaagaauu	831	asAfsuucu(Tgn)gguaauUfgAfagaccsasg	832	CUGGUCUUCAAUUACCAAGAAUU	833
AD-392971	csasgga(Uhd)AfuGfAfAfguucaucauu	834	asAfsugau(Ggn)aacuucAfuAfuccugsasg	835	CUCAGGAUAUGAAGUUCAUCAUC	836
AD-392972	ascsaca(Uhd)CfaGfUfAfauguauucua	837	usAfsgaau(Agn)cauuacUfgAfugugusgsg	838	CCACACAUCAGUAAUGUAUUCUA	839
AD-392973	csusaua(Chd)UfaCfAfUfuauuaauggu	840	asCfscauu(Agn)auaaugUfaGfuauagsasg	841	CUCUAUACUACAUUAUUAAUGGG	842
AD-392974	cscscgu(Uhd)UfuAfUfGfauuuacucau	843	asUfsgagu(Agn)aaucauAfaAfacgggsusu	844	AACCCGUUUUAUGAUUUACUCAU	845
AD-392975	ususcca(Uhd)GfaCfUfGfcauuuuacuu	846	asAfsguaa(Agn)augcagUfcAfuggaasasa	847	UUUUCCAUGACUGCAUUUUACUG	848
AD-392976	uscsuuc(Ahd)AfuUfAfCfcaagaauucu	849	asGfsaauu(Cgn)uugguaAfuUfgaagascsc	850	GGUCUUCAAUUACCAAGAAUUCU	851
AD-392977	csusgaa(Ghd)UfuUfCfAfuuuaugauau	852	asUfsauca(Tgn)aaaugaAfaCfuucagsasc	853	GUCUGAAGUUUCAUUUAUGAUAC	854

Таблица 3. Немодифицированные последовательности APP, нацеливание на NM_000484 человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Положение в NM_000484	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Положение в NM_000484
AD-392853	GCGCCAUGUCCCAAAGUUUAU	855	1228-1248	AUAAACTUUGGGACAUGGCGCUG	856	1226-1248
AD-392857	CUUGCCCGAGAUCCUGUUAAA	857	1269-1289	UUUAACAGGAUCUCGGGCAAGAG	858	1267-1289
AD-392851	UUGCCCGAGAUCCUGUUAAAU	859	1270-1290	AUUUAACAGGAUCUCGGGCAAGA	860	1268-1290
AD-392811	UGCCCGAGAUCCUGUUAAACU	861	1271-1291	AGUUUAACAGGAUCUCGGGCAAG	862	1269-1291
AD-392910	GAUCCUGUUAAACUUCCUACA	863	1278-1298	UGUAGGAAGUUUAACAGGAUCUC	864	1276-1298
AD-392890	AUCCUGUUAAACUUCCUACAA	865	1279-1299	UUGUAGGAAGUUUAACAGGAUCU	866	1277-1299
AD-392911	CUGCUUCAGAAAGAGCAAAAU	867	1893-1913	AUUUUGCUCUUUCUGAAGCAGCU	868	1891-1913
AD-392912	CAGAAAGAGCAAAACUAUUCA	869	1899-1919	UGAAUAGUUUUGCUCUUUCUGAA	870	1897-1919
AD-392778	GAGCAAAACUAUUCAGAUGAU	871	1905-1925	AUCAUCTGAAUAGUUUUGCUCUU	872	1903-1925
AD-392727	AAAACUAUUCAGAUGACGUCU	873	1909-1929	AGACGUCAUCUGAAUAGUUUUGC	874	1907-1929
AD-392728	AAACUAUUCAGAUGACGUCUU	875	1910-1930	AAGACGTCAUCUGAAUAGUUUUG	876	1908-1930

AD-392891	ACUAUUCAGAUGACGUCUUGU	877	1912-1932	ACAAGACGUCAUCUGAAUAGUUU	878	1910-1932
AD-392822	UUCAGAUGACGUCUUGGCCAA	879	1916-1936	UUGGCCAAGACGUCAUCUGAAUA	880	1914-1936
AD-392749	GGCCAACAUGAUUAGUGAACU	881	1931-1951	AGUUCACUAAUCAUGUUGGCCAA	882	1929-1951
AD-392794	CCAACAUGAUUAGUGAACCAA	883	1933-1953	UUGGUUCACUAAUCAUGUUGGCC	884	1931-1953
AD-392795	AUGAUUAGUGAACCAAGGAUU	885	1938-1958	AAUCCUTGGUUCACUAAUCAUGU	886	1936-1958
AD-392812	AUUAGUGAACCAAGGAUCAGU	887	1941-1961	ACUGAUCCUUGGUUCACUAAUCA	888	1939-1961
AD-392796	UUAGUGAACCAAGGAUCAGUU	889	1942-1962	AACUGATCCUUGGUUCACUAAUC	890	1940-1962
AD-392779	AGUGAACCAAGGAUCAGUUAU	891	1944-1964	AUAACUGAUCCUUGGUUCACUAA	892	1942-1964
AD-392780	UGAACCAAGGAUCAGUUACGU	893	1946-1966	ACGUAACUGAUCCUUGGUUCACU	894	1944-1966
AD-392813	GAACCAAGGAUCAGUUACGGA	895	1947-1967	UCCGUAACUGAUCCUUGGUUCAC	896	1945-1967
AD-392797	AACCAAGGAUCAGUUACGGAA	897	1948-1968	UUCCGUAACUGAUCCUUGGUUCA	898	1946-1968
AD-392761	CAAGGAUCAGUUACGGAAACU	899	1951-1971	AGUUUCCGUAACUGAUCCUUGGU	900	1949-1971
AD-392814	AAGGAUCAGUUACGGAAACGA	901	1952-1972	UCGUUUCCGUAACUGAUCCUUGG	902	1950-1972
AD-392742	GGAUCAGUUACGGAAACGAUU	903	1954-1974	AAUCGUTUCCGUAACUGAUCCUU	904	1952-1974
AD-392750	GAUCAGUUACGGAAACGAUGU	905	1955-1975	ACAUCGTUUCCGUAACUGAUCCU	906	1953-1975
AD-392823	AUCAGUUACGGAAACGAUGCU	907	1956-1976	AGCAUCGUUUCCGUAACUGAUCC	908	1954-1976
AD-392789	UCAGUUACGGAAACGAUGCUU	909	1957-1977	AAGCAUCGUUUCCGUAACUGAUC	910	1955-1977
AD-392781	CAGUUACGGAAACGAUGCUCU	911	1958-1978	AGAGCATCGUUUCCGUAACUGAU	912	1956-1978
AD-392798	GUUACGGAAACGAUGCUCUCA	913	1960-1980	UGAGAGCAUCGUUUCCGUAACUG	914	1958-1980
AD-392751	UACGGAAACGAUGCUCUCAUU	915	1962-1982	AAUGAGAGCAUCGUUUCCGUAAC	916	1960-1982
AD-392858	CUCAUGCCAUCUUUGACCGAA	917	1977-1997	UUCGGUCAAAGAUGGCAUGAGAG	918	1975-1997
AD-392844	UCAUGCCAUCUUUGACCGAAA	919	1978-1998	UUUCGGTCAAAGAUGGCAUGAGA	920	1976-1998
AD-392842	CAUGCCAUCUUUGACCGAAAU	921	1979-1999	AUUUCGGUCAAAGAUGGCAUGAG	922	1977-1999
AD-392848	AUGCCAUCUUUGACCGAAACU	923	1980-2000	AGUUUCGGUCAAAGAUGGCAUGA	924	1978-2000
AD-392838	GCCAUCUUUGACCGAAACGAA	925	1982-2002	UUCGUUTCGGUCAAAGAUGGCAU	926	1980-2002
AD-392839	CCAUCUUUGACCGAAACGAAA	927	1983-2003	UUUCGUTUCGGUCAAAGAUGGCA	928	1981-2003
AD-392734	UCUUUGACCGAAACGAAAACU	929	1986-2006	AGUUUUCGUUUCGGUCAAAGAUG	930	1984-2006
AD-392790	CUUCCCGUGAAUGGAGAGUUU	931	2019-2039	AAACUCTCCAUUCACGGGAAGGA	932	2017-2039
AD-392815	CAACACAGAAAACGAAGUUGA	933	2093-2113	UCAACUTCGUUUUCUGUGUUGGC	934	2091-2113
AD-392762	AGGUUCUGGGUUGACAAAUAU	935	2162-2182	AUAUUUGUCAACCCAGAACCUGG	936	2160-2182
AD-392735	GUUCUGGGUUGACAAAUAUCA	937	2164-2184	UGAUAUTUGUCAACCCAGAACCU	938	2162-2184
AD-392743	CUGGGUUGACAAAUAUCAAGA	939	2167-2187	UCUUGATAUUUGUCAACCCAGAA	940	2165-2187
AD-392736	UGGGUUGACAAAUAUCAAGAU	941	2168-2188	AUCUUGAUAUUUGUCAACCCAGA	942	2166-2188
AD-392824	UGGAUGCAGAAUUCCGACAUU	943	2212-2232	AAUGUCGGAAUUCUGCAUCCAUC	944	2210-2232

AD-392799	GAUGCAGAAUUCCGACAUGAU	945	2214-2234	AUCAUGTCGGAAUUCUGCAUCCA	946	2212-2234
AD-392971	CAGGAUAUGAAGUUCAUCAUU	947	2236-2256	AAUGAUGAACUUCAUAUCCUGAG	948	2234-2256
AD-392913	UAUGAAGUUCAUCAUCAAAAA	949	2241-2261	UUUUUGAUGAUGAACUUCAUAUC	950	2239-2261
AD-392892	GUUCAUCAUCAAAAAUUGGUU	951	2247-2267	AACCAATUUUUGAUGAUGAACUU	952	2245-2267
AD-392914	CAUCAUCAAAAAUUGGUGUUU	953	2250-2270	AAACACCAAUUUUUGAUGAUGAA	954	2248-2270
AD-392860	CAUCAAAAAUUGGUGUUCUUU	955	2253-2273	AAAGAACACCAAUUUUUGAUGAU	956	2251-2273
AD-392875	AUCAAAAAUUGGUGUUCUUUG	957	2254-2274	CAAAGAACACCAAUUUUUGAUGA	958	2252-2274
AD-392915	UCAAAAAUUGGUGUUCUUUGU	959	2255-2275	ACAAAGAACACCAAUUUUUGAUG	960	2253-2275
AD-392782	AGAAGAUGUGGGUUCAAACAA	961	2276-2296	UUGUUUGAACCCACAUCUUCUGC	962	2274-2296
AD-392763	AAGAUGUGGGUUCAAACAAAU	963	2278-2298	AUUUGUTUGAACCCACAUCUUCU	964	2276-2298
AD-392816	UGGGUUCAAACAAAGGUGCAA	965	2284-2304	UUGCACCUUUGUUUGAACCCACA	966	2282-2304
AD-392704	GGUUCAAACAAAGGUGCAAUU	967	2286-2306	AAUUGCACCUUUGUUUGAACCCA	968	2284-2306
AD-392854	GUCAUAGCGACAGUGAUCGUU	969	2331-2351	AACGAUCACUGUCGCUAUGACAA	970	2329-2351
AD-392856	AUAGCGACAGUGAUCGUCAUU	971	2334-2354	AAUGACGAUCACUGUCGCUAUGA	972	2332-2354
AD-392817	CAGUGAUCGUCAUCACCUUGU	973	2341-2361	ACAAGGTGAUGACGAUCACUGUC	974	2339-2361
AD-392764	CUGAAGAAGAAACAGUACACA	975	2367-2387	UGUGUACUGUUUCUUCUUCAGCA	976	2365-2387
AD-392845	CAGUACACAUCCAUUCAUCAU	977	2379-2399	AUGAUGAAUGGAUGUGUACUGUU	978	2377-2399
AD-392825	GUCCAAGAUGCAGCAGAACGU	979	2447-2467	ACGUUCTGCUGCAUCUUGGACAG	980	2445-2467
AD-392849	GAACGGCUACGAAAAUCCAAU	981	2462-2482	AUUGGATUUUCGUAGCCGUUCUG	982	2460-2482
AD-392846	AACGGCUACGAAAAUCCAACU	983	2463-2483	AGUUGGAUUUUCGUAGCCGUUCU	984	2461-2483
AD-392859	ACGGCUACGAAAAUCCAACCU	985	2464-2484	AGGUUGGAUUUUCGUAGCCGUUC	986	2462-2484
AD-392843	GGCUACGAAAAUCCAACCUAU	987	2466-2486	AUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	988	2464-2486
AD-392855	GCUACGAAAAUCCAACCUACA	989	2467-2487	UGUAGGTUGGAUUUUCGUAGCCG	990	2465-2487
AD-392840	CUACGAAAAUCCAACCUACAA	991	2468-2488	UUGUAGGUUGGAUUUUCGUAGCC	992	2466-2488
AD-392835	UACGAAAAUCCAACCUACAAU	993	2469-2489	AUUGUAGGUUGGAUUUUCGUAGC	994	2467-2489
AD-392729	ACGAAAAUCCAACCUACAAGU	995	2470-2490	ACUUGUAGGUUGGAUUUUCGUAG	996	2468-2490
AD-392916	AAAAUCCAACCUACAAGUUCU	997	2473-2493	AGAACUTGUAGGUUGGAUUUUCG	998	2471-2493
AD-392876	AAAUCCAACCUACAAGUUCUU	999	2474-2494	AAGAACTUGUAGGUUGGAUUUUC	1000	2472-2494
AD-392861	AUCCAACCUACAAGUUCUUUG	1001	2476-2496	CAAAGAACUUGUAGGUUGGAUUU	1002	2474-2496
AD-392863	UCCAACCUACAAGUUCUUUGA	1003	2477-2497	UCAAAGAACUUGUAGGUUGGAUU	1004	2475-2497
AD-392917	CCAACCUACAAGUUCUUUGAU	1005	2478-2498	AUCAAAGAACUUGUAGGUUGGAU	1006	2476-2498
AD-392783	CCUCUGAAGUUGGACAGCAAA	1007	2530-2550	UUUGCUGUCCAACUUCAGAGGCU	1008	2528-2550
AD-392765	AAGUUGGACAGCAAAACCAUU	1009	2536-2556	AAUGGUTUUGCUGUCCAACUUCA	1010	2534-2556
AD-392791	AGUUGGACAGCAAAACCAUUU	1011	2537-2557	AAAUGGTUUUGCUGUCCAACUUC	1012	2535-2557

AD-392800	UUGGACAGCAAAACCAUUGCU	1013	2539-2559	AGCAAUGGUUUUGCUGUCCAACU	1014	2537-2559
AD-392711	GCAAAACCAUUGCUUCACUAU	1015	2546-2566	AUAGUGAAGCAAUGGUUUUGCUG	1016	2544-2566
AD-392801	AAACCAUUGCUUCACUACCCA	1017	2549-2569	UGGGUAGUGAAGCAAUGGUUUUG	1018	2547-2569
AD-392826	UACCCAUCGGUGUCCAUUUAU	1019	2564-2584	AUAAAUGGACACCGAUGGGUAGU	1020	2562-2584
AD-392818	ACCCAUCGGUGUCCAUUUAUA	1021	2565-2585	UAUAAATGGACACCGAUGGGUAG	1022	2563-2585
AD-392792	CCCAUCGGUGUCCAUUUAUAU	1023	2566-2586	AUAUAAAUGGACACCGAUGGGUA	1024	2564-2586
AD-392802	CCAUCGGUGUCCAUUUAUAGA	1025	2567-2587	UCUAUAAAUGGACACCGAUGGGU	1026	2565-2587
AD-392766	AUCGGUGUCCAUUUAUAGAAU	1027	2569-2589	AUUCUATAAAUGGACACCGAUGG	1028	2567-2589
AD-392767	UCGGUGUCCAUUUAUAGAAUA	1029	2570-2590	UAUUCUAUAAAUGGACACCGAUG	1030	2568-2590
AD-392834	ACCCGUUUUAUGAUUUACUCA	1031	2607-2627	UGAGUAAAUCAUAAAACGGGUUU	1032	2605-2627
AD-392974	CCCGUUUUAUGAUUUACUCAU	1033	2608-2628	AUGAGUAAAUCAUAAAACGGGUU	1034	2606-2628
AD-392784	UUAUGAUUUACUCAUUAUCGU	1035	2614-2634	ACGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAA	1036	2612-2634
AD-392744	AUGAUUUACUCAUUAUCGCCU	1037	2616-2636	AGGCGATAAUGAGUAAAUCAUAA	1038	2614-2636
AD-392752	UGAUUUACUCAUUAUCGCCUU	1039	2617-2637	AAGGCGAUAAUGAGUAAAUCAUA	1040	2615-2637
AD-392737	GAUUUACUCAUUAUCGCCUUU	1041	2618-2638	AAAGGCGAUAAUGAGUAAAUCAU	1042	2616-2638
AD-392712	AUUUACUCAUUAUCGCCUUUU	1043	2619-2639	AAAAGGCGAUAAUGAGUAAAUCA	1044	2617-2639
AD-392705	UUUACUCAUUAUCGCCUUUUG	1045	2620-2640	CAAAAGGCGAUAAUGAGUAAAUC	1046	2618-2640
AD-392713	UACUCAUUAUCGCCUUUUGAU	1047	2622-2642	AUCAAAAGGCGAUAAUGAGUAAA	1048	2620-2642
AD-392918	ACUCAUUAUCGCCUUUUGACA	1049	2623-2643	UGUCAAAAGGCGAUAAUGAGUAA	1050	2621-2643
AD-392919	CUCAUUAUCGCCUUUUGACAU	1051	2624-2644	AUGUCAAAAGGCGAUAAUGAGUA	1052	2622-2644
AD-392803	UUAUCGCCUUUUGACAGCUGU	1053	2628-2648	ACAGCUGUCAAAAGGCGAUAAUG	1054	2626-2648
AD-392804	AUCGCCUUUUGACAGCUGUGU	1055	2630-2650	ACACAGCUGUCAAAAGGCGAUAA	1056	2628-2650
AD-392827	UUUUGACAGCUGUGCUGUAAU	1057	2636-2656	AUUACAGCACAGCUGUCAAAAGG	1058	2634-2656
AD-392828	UUGACAGCUGUGCUGUAACAU	1059	2638-2658	AUGUUACAGCACAGCUGUCAAAA	1060	2636-2658
AD-392785	ACAGCUGUGCUGUAACACAAU	1061	2641-2661	AUUGUGTUACAGCACAGCUGUCA	1062	2639-2661
AD-392829	AGCUGUGCUGUAACACAAGUA	1063	2643-2663	UACUUGTGUUACAGCACAGCUGU	1064	2641-2663
AD-392920	UGUGCUGUAACACAAGUAGAU	1065	2646-2666	AUCUACTUGUGUUACAGCACAGC	1066	2644-2666
AD-392921	GUGCUGUAACACAAGUAGAUU	1067	2647-2667	AAUCUACUUGUGUUACAGCACAG	1068	2645-2667
AD-392768	GCUGUAACACAAGUAGAUGCU	1069	2649-2669	AGCAUCTACUUGUGUUACAGCAC	1070	2647-2669
AD-392805	ACACAAGUAGAUGCCUGAACU	1071	2655-2675	AGUUCAGGCAUCUACUUGUGUUA	1072	2653-2675
AD-392769	AAGUAGAUGCCUGAACUUGAA	1073	2659-2679	UUCAAGTUCAGGCAUCUACUUGU	1074	2657-2679
AD-392753	GUAGAUGCCUGAACUUGAAUU	1075	2661-2681	AAUUCAAGUUCAGGCAUCUACUU	1076	2659-2681
AD-392714	UGCCUGAACUUGAAUUAAUCU	1077	2666-2686	AGAUUAAUUCAAGUUCAGGCAUC	1078	2664-2686
AD-392703	CCUGAACUUGAAUUAAUCCAU	1079	2668-2688	AUGGAUTAAUUCAAGUUCAGGCA	1080	2666-2688

AD-392715	CUGAACUUGAAUUAAUCCACA	1081	2669-2689	UGUGGATUAAUUCAAGUUCAGGC	1082	2667-2689
AD-392841	AUCCACACAUCAGUAAUGUAU	1083	2683-2703	AUACAUTACUGAUGUGUGGAUUA	1084	2681-2703
AD-392836	UCCACACAUCAGUAAUGUAUU	1085	2684-2704	AAUACATUACUGAUGUGUGGAUU	1086	2682-2704
AD-392966	CCACACAUCAGUAAUGUAUUU	1087	2685-2705	AAAUACAUUACUGAUGUGUGGAU	1088	2683-2705
AD-392832	CACACAUCAGUAAUGUAUUCU	1089	2686-2706	AGAAUACAUUACUGAUGUGUGGA	1090	2684-2706
AD-392972	ACACAUCAGUAAUGUAUUCUA	1091	2687-2707	UAGAAUACAUUACUGAUGUGUGG	1092	2685-2707
AD-392961	UGUAUUCUAUCUCUCUUUACA	1093	2699-2719	UGUAAAGAGAGAUAGAAUACAUU	1094	2697-2719
AD-392967	CUAUCUCUCUUUACAUUUUGU	1095	2705-2725	ACAAAATGUAAAGAGAGAUAGAA	1096	2703-2725
AD-392893	UAUCUCUCUUUACAUUUUGGU	1097	2706-2726	ACCAAAAUGUAAAGAGAGAUAGA	1098	2704-2726
AD-392894	AUCUCUCUUUACAUUUUGGUU	1099	2707-2727	AACCAAAAUGUAAAGAGAGAUAG	1100	2705-2727
AD-392864	UCUCUCUUUACAUUUUGGUCU	1101	2708-2728	AGACCAAAAUGUAAAGAGAGAUA	1102	2706-2728
AD-392865	CUCUCUUUACAUUUUGGUCUU	1103	2709-2729	AAGACCAAAAUGUAAAGAGAGAU	1104	2707-2729
AD-392922	UCUUUACAUUUUGGUCUCUAU	1105	2712-2732	AUAGAGACCAAAAUGUAAAGAGA	1106	2710-2732
AD-392833	UGGUCUCUAUACUACAUUAUU	1107	2723-2743	AAUAAUGUAGUAUAGAGACCAAA	1108	2721-2743
AD-392968	GGUCUCUAUACUACAUUAUUA	1109	2724-2744	UAAUAATGUAGUAUAGAGACCAA	1110	2722-2744
AD-392962	GUCUCUAUACUACAUUAUUAA	1111	2725-2745	UUAAUAAUGUAGUAUAGAGACCA	1112	2723-2745
AD-392963	UCUCUAUACUACAUUAUUAAU	1113	2726-2746	AUUAAUAAUGUAGUAUAGAGACC	1114	2724-2746
AD-392964	CUCUAUACUACAUUAUUAAUU	1115	2727-2747	AAUUAATAAUGUAGUAUAGAGAC	1116	2725-2747
AD-392969	UCUAUACUACAUUAUUAAUGU	1117	2728-2748	ACAUUAAUAAUGUAGUAUAGAGA	1118	2726-2748
AD-392973	CUAUACUACAUUAUUAAUGGU	1119	2729-2749	ACCAUUAAUAAUGUAGUAUAGAG	1120	2727-2749
AD-392923	AUGGGUUUUGUGUACUGUAAA	1121	2745-2765	UUUACAGUACACAAAACCCAUUA	1122	2743-2765
AD-392866	UUUGUGUACUGUAAAGAAUUU	1123	2751-2771	AAAUUCTUUACAGUACACAAAAC	1124	2749-2771
AD-392924	UUGUGUACUGUAAAGAAUUUA	1125	2752-2772	UAAAUUCUUUACAGUACACAAAA	1126	2750-2772
AD-392895	UGUGUACUGUAAAGAAUUUAU	1127	2753-2773	AUAAAUTCUUUACAGUACACAAA	1128	2751-2773
AD-392867	GUGUACUGUAAAGAAUUUAGU	1129	2754-2774	ACUAAATUCUUUACAGUACACAA	1130	2752-2774
AD-392877	GUACUGUAAAGAAUUUAGCUU	1131	2756-2776	AAGCUAAAUUCUUUACAGUACAC	1132	2754-2776
AD-392707	AUUUAGCUGUAUCAAACUAGU	1133	2768-2788	ACUAGUTUGAUACAGCUAAAUUC	1134	2766-2788
AD-392716	UUUAGCUGUAUCAAACUAGUU	1135	2769-2789	AACUAGTUUGAUACAGCUAAAUU	1136	2767-2789
AD-392925	GCUGUAUCAAACUAGUGCAUU	1137	2773-2793	AAUGCACUAGUUUGAUACAGCUA	1138	2771-2793
AD-392926	CUAGUGCAUGAAUAGAUUCUU	1139	2784-2804	AAGAAUCUAUUCAUGCACUAGUU	1140	2782-2804
AD-392927	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCU	1141	2785-2805	AGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	1142	2783-2805
AD-392717	GAAUAGAUUCUCUCCUGAUUA	1143	2793-2813	UAAUCAGGAGAGAAUCUAUUCAU	1144	2791-2813
AD-392928	CUCUCCUGAUUAUUUAUCACA	1145	2802-2822	UGUGAUAAAUAAUCAGGAGAGAA	1146	2800-2822
AD-392700	UCUCCUGAUUAUUUAUCACAU	1147	2803-2823	AUGUGATAAAUAAUCAGGAGAGA	1148	2801-2823

AD-392878	CUCCUGAUUAUUUAUCACAUA	1149	2804-2824	UAUGUGAUAAAUAAUCAGGAGAG	1150	2802-2824
AD-392718	UCCUGAUUAUUUAUCACAUAU	1151	2805-2825	AUAUGUGAUAAAUAAUCAGGAGA	1152	2803-2825
AD-392929	CCUGAUUAUUUAUCACAUAGU	1153	2806-2826	ACUAUGUGAUAAAUAAUCAGGAG	1154	2804-2826
AD-392879	GCCAGUUGUAUAUUAUUCUUU	1155	2833-2853	AAAGAATAAUAUACAACUGGCUA	1156	2831-2853
AD-392754	UUGUAUAUUAUUCUUGUGGUU	1157	2838-2858	AACCACAAGAAUAAUAUACAACU	1158	2836-2858
AD-392819	UCUUGUGGUUUGUGACCCAAU	1159	2849-2869	AUUGGGTCACAAACCACAAGAAU	1160	2847-2869
AD-392745	CUUGUGGUUUGUGACCCAAUU	1161	2850-2870	AAUUGGGUCACAAACCACAAGAA	1162	2848-2870
AD-392770	UUGUGGUUUGUGACCCAAUUA	1163	2851-2871	UAAUUGGGUCACAAACCACAAGA	1164	2849-2871
AD-392806	UGUGGUUUGUGACCCAAUUAA	1165	2852-2872	UUAAUUGGGUCACAAACCACAAG	1166	2850-2872
AD-392771	GUUUGUGACCCAAUUAAGUCU	1167	2856-2876	AGACUUAAUUGGGUCACAAACCA	1168	2854-2876
AD-392820	UUUGUGACCCAAUUAAGUCCU	1169	2857-2877	AGGACUTAAUUGGGUCACAAACC	1170	2855-2877
AD-392821	UUGUGACCCAAUUAAGUCCUA	1171	2858-2878	UAGGACTUAAUUGGGUCACAAAC	1172	2856-2878
AD-392786	UGUGACCCAAUUAAGUCCUAU	1173	2859-2879	AUAGGACUUAAUUGGGUCACAAA	1174	2857-2879
AD-392772	GUGACCCAAUUAAGUCCUACU	1175	2860-2880	AGUAGGACUUAAUUGGGUCACAA	1176	2858-2880
AD-392699	GACCCAAUUAAGUCCUACUUU	1177	2862-2882	AAAGUAGGACUUAAUUGGGUCAC	1178	2860-2882
AD-392868	ACCCAAUUAAGUCCUACUUUA	1179	2863-2883	UAAAGUAGGACUUAAUUGGGUCA	1180	2861-2883
AD-392719	CCCAAUUAAGUCCUACUUUAU	1181	2864-2884	AUAAAGTAGGACUUAAUUGGGUC	1182	2862-2884
AD-392880	AAUUAAGUCCUACUUUACAUA	1183	2867-2887	UAUGUAAAGUAGGACUUAAUUGG	1184	2865-2887
AD-392930	UAAGUCCUACUUUACAUAUGU	1185	2870-2890	ACAUAUGUAAAGUAGGACUUAAU	1186	2868-2890
AD-392931	AGUCCUACUUUACAUAUGCUU	1187	2872-2892	AAGCAUAUGUAAAGUAGGACUUA	1188	2870-2892
AD-392932	GUCCUACUUUACAUAUGCUUU	1189	2873-2893	AAAGCATAUGUAAAGUAGGACUU	1190	2871-2893
AD-392869	UCCUACUUUACAUAUGCUUUA	1191	2874-2894	UAAAGCAUAUGUAAAGUAGGACU	1192	2872-2894
AD-392870	CCUACUUUACAUAUGCUUUAA	1193	2875-2895	UUAAAGCAUAUGUAAAGUAGGAC	1194	2873-2895
AD-392896	CUACUUUACAUAUGCUUUAAU	1195	2876-2896	AUUAAAGCAUAUGUAAAGUAGGA	1196	2874-2896
AD-392787	UACAUAUGCUUUAAGAAUCGA	1197	2882-2902	UCGAUUCUUAAAGCAUAUGUAAA	1198	2880-2902
AD-392720	CAUAUGCUUUAAGAAUCGAUU	1199	2884-2904	AAUCGATUCUUAAAGCAUAUGUA	1200	2882-2904
AD-392746	AUAUGCUUUAAGAAUCGAUGU	1201	2885-2905	ACAUCGAUUCUUAAAGCAUAUGU	1202	2883-2905
AD-392773	UAUGCUUUAAGAAUCGAUGGU	1203	2886-2906	ACCAUCGAUUCUUAAAGCAUAUG	1204	2884-2906
AD-392807	GGGAUGCUUCAUGUGAACGUU	1205	2906-2926	AACGUUCACAUGAAGCAUCCCCC	1206	2904-2926
AD-392730	UGCUUCUCUUGCCUAAGUAUU	1207	2937-2957	AAUACUTAGGCAAGAGAAGCAGC	1208	2935-2957
AD-392721	CUUCUCUUGCCUAAGUAUUCU	1209	2939-2959	AGAAUACUUAGGCAAGAGAAGCA	1210	2937-2959
AD-392933	UUCUCUUGCCUAAGUAUUCCU	1211	2940-2960	AGGAAUACUUAGGCAAGAGAAGC	1212	2938-2960
AD-392934	CUCUUGCCUAAGUAUUCCUUU	1213	2942-2962	AAAGGAAUACUUAGGCAAGAGAA	1214	2940-2962
AD-392881	CUUGCCUAAGUAUUCCUUUCU	1215	2944-2964	AGAAAGGAAUACUUAGGCAAGAG	1216	2942-2964

AD-392897	UGCCUAAGUAUUCCUUUCCUU	1217	2946-2966	AAGGAAAGGAAUACUUAGGCAAG	1218	2944-2966
AD-392898	AAGUAUUCCUUUCCUGAUCAU	1219	2951-2971	AUGAUCAGGAAAGGAAUACUUAG	1220	2949-2971
AD-392708	AGUAUUCCUUUCCUGAUCACU	1221	2952-2972	AGUGAUCAGGAAAGGAAUACUUA	1222	2950-2972
AD-392899	GUAUUCCUUUCCUGAUCACUA	1223	2953-2973	UAGUGATCAGGAAAGGAAUACUU	1224	2951-2973
AD-392935	UAUUCCUUUCCUGAUCACUAU	1225	2954-2974	AUAGUGAUCAGGAAAGGAAUACU	1226	2952-2974
AD-392882	AUUCCUUUCCUGAUCACUAUU	1227	2955-2975	AAUAGUGAUCAGGAAAGGAAUAC	1228	2953-2975
AD-392738	UCCUUUCCUGAUCACUAUGCA	1229	2957-2977	UGCAUAGUGAUCAGGAAAGGAAU	1230	2955-2977
AD-392739	CUUUCCUGAUCACUAUGCAUU	1231	2959-2979	AAUGCATAGUGAUCAGGAAAGGA	1232	2957-2979
AD-392936	UUUCCUGAUCACUAUGCAUUU	1233	2960-2980	AAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAGG	1234	2958-2980
AD-392900	UUCCUGAUCACUAUGCAUUUU	1235	2961-2981	AAAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAG	1236	2959-2981
AD-392901	CUGAUCACUAUGCAUUUUAAA	1237	2964-2984	UUUAAAAUGCAUAGUGAUCAGGA	1238	2962-2984
AD-392937	CACUAUGCAUUUUAAAGUUAA	1239	2969-2989	UUAACUTUAAAAUGCAUAGUGAU	1240	2967-2989
AD-392883	ACUAUGCAUUUUAAAGUUAAA	1241	2970-2990	UUUAACTUUAAAAUGCAUAGUGA	1242	2968-2990
AD-392975	UUCCAUGACUGCAUUUUACUU	1243	3029-3049	AAGUAAAAUGCAGUCAUGGAAAA	1244	3027-3049
AD-392938	CUGCAUUUUACUGUACAGAUU	1245	3037-3057	AAUCUGTACAGUAAAAUGCAGUC	1246	3035-3057
AD-392755	AUUGCUGCUUCUGCUAUAUUU	1247	3055-3075	AAAUAUAGCAGAAGCAGCAAUCU	1248	3053-3075
AD-392939	UUCUGCUAUAUUUGUGAUAUA	1249	3063-3083	UAUAUCACAAAUAUAGCAGAAGC	1250	3061-3083
AD-392940	UCUGCUAUAUUUGUGAUAUAU	1251	3064-3084	AUAUAUCACAAAUAUAGCAGAAG	1252	3062-3084
AD-392756	UGCUAUAUUUGUGAUAUAGGA	1253	3066-3086	UCCUAUAUCACAAAUAUAGCAGA	1254	3064-3086
AD-392774	UUUGUGAUAUAGGAAUUAAGA	1255	3073-3093	UCUUAATUCCUAUAUCACAAAUA	1256	3071-3093
AD-392850	UCUUCGUGCCUGUUUUAUGUU	1257	3111-3131	AACAUAAAACAGGCACGAAGAAA	1258	3109-3131
AD-392852	CUUCGUGCCUGUUUUAUGUGU	1259	3112-3132	ACACAUAAAACAGGCACGAAGAA	1260	3110-3132
AD-392830	GUUUUAUGUGCACACAUUAGU	1261	3122-3142	ACUAAUGUGUGCACAUAAAACAG	1262	3120-3142
AD-392808	UGUGCACACAUUAGGCAUUGA	1263	3128-3148	UCAAUGCCUAAUGUGUGCACAUA	1264	3126-3148
AD-392793	UGCACACAUUAGGCAUUGAGA	1265	3130-3150	UCUCAATGCCUAAUGUGUGCACA	1266	3128-3150
AD-392757	ACACAUUAGGCAUUGAGACUU	1267	3133-3153	AAGUCUCAAUGCCUAAUGUGUGC	1268	3131-3153
AD-392747	UUUGUCCACGUAUCUUUGGGU	1269	3168-3188	ACCCAAAGAUACGUGGACAAAAA	1270	3166-3188
AD-392902	CACGUAUCUUUGGGUCUUUGA	1271	3174-3194	UCAAAGACCCAAAGAUACGUGGA	1272	3172-3194
AD-392941	ACGUAUCUUUGGGUCUUUGAU	1273	3175-3195	AUCAAAGACCCAAAGAUACGUGG	1274	3173-3195
AD-392942	UCUUUGGGUCUUUGAUAAAGA	1275	3180-3200	UCUUUATCAAAGACCCAAAGAUA	1276	3178-3200
AD-392943	CUUUGGGUCUUUGAUAAAGAA	1277	3181-3201	UUCUUUAUCAAAGACCCAAAGAU	1278	3179-3201
AD-392944	UUGGGUCUUUGAUAAAGAAAA	1279	3183-3203	UUUUCUTUAUCAAAGACCCAAAG	1280	3181-3203
AD-392903	UGGGUCUUUGAUAAAGAAAAU	1281	3184-3204	AUUUUCTUUAUCAAAGACCCAAA	1282	3182-3204
AD-392775	AAAGAAUCCCUGUUCAUUGUA	1283	3201-3221	UACAAUGAACAGGGAUUCUUUUC	1284	3199-3221

AD-392758	AAGAAUCCCUGUUCAUUGUAA	1285	3202-3222	UUACAATGAACAGGGAUUCUUUU	1286	3200-3222
AD-392945	AGAAUCCCUGUUCAUUGUAAU	1287	3203-3223	AUUACAAUGAACAGGGAUUCUUU	1288	3201-3223
AD-392946	GAAUCCCUGUUCAUUGUAAGU	1289	3204-3224	ACUUACAAUGAACAGGGAUUCUU	1290	3202-3224
AD-392884	UGUUCAUUGUAAGCACUUUUA	1291	3211-3231	UAAAAGTGCUUACAAUGAACAGG	1292	3209-3231
AD-392947	GUUCAUUGUAAGCACUUUUAU	1293	3212-3232	AUAAAAGUGCUUACAAUGAACAG	1294	3210-3232
AD-392748	UCAUUGUAAGCACUUUUACGU	1295	3214-3234	ACGUAAAAGUGCUUACAAUGAAC	1296	3212-3234
AD-392759	CAUUGUAAGCACUUUUACGGU	1297	3215-3235	ACCGUAAAAGUGCUUACAAUGAA	1298	3213-3235
AD-392837	CUGGUCUUCAAUUACCAAGAA	1299	3258-3278	UUCUUGGUAAUUGAAGACCAGCA	1300	3256-3278
AD-392970	GGUCUUCAAUUACCAAGAAUU	1301	3260-3280	AAUUCUTGGUAAUUGAAGACCAG	1302	3258-3280
AD-392976	UCUUCAAUUACCAAGAAUUCU	1303	3262-3282	AGAAUUCUUGGUAAUUGAAGACC	1304	3260-3282
AD-392965	CUUCAAUUACCAAGAAUUCUU	1305	3263-3283	AAGAAUTCUUGGUAAUUGAAGAC	1306	3261-3283
AD-392831	UUCAAUUACCAAGAAUUCUCU	1307	3264-3284	AGAGAATUCUUGGUAAUUGAAGA	1308	3262-3284
AD-392904	UCAAUUACCAAGAAUUCUCCA	1309	3265-3285	UGGAGAAUUCUUGGUAAUUGAAG	1310	3263-3285
AD-392885	AAUUACCAAGAAUUCUCCAAA	1311	3267-3287	UUUGGAGAAUUCUUGGUAAUUGA	1312	3265-3287
AD-392886	UUACCAAGAAUUCUCCAAAAU	1313	3269-3289	AUUUUGGAGAAUUCUUGGUAAUU	1314	3267-3289
AD-392776	UGAUUGUACAGAAUCAUUGCU	1315	3304-3324	AGCAAUGAUUCUGUACAAUCAUC	1316	3302-3324
AD-392887	UCAUUGCUUAUGACAUGAUCU	1317	3317-3337	AGAUCATGUCAUAAGCAAUGAUU	1318	3315-3337
AD-392722	CAUUGCUUAUGACAUGAUCGU	1319	3318-3338	ACGAUCAUGUCAUAAGCAAUGAU	1320	3316-3338
AD-392740	AUUGCUUAUGACAUGAUCGCU	1321	3319-3339	AGCGAUCAUGUCAUAAGCAAUGA	1322	3317-3339
AD-392760	UUGCUUAUGACAUGAUCGCUU	1323	3320-3340	AAGCGATCAUGUCAUAAGCAAUG	1324	3318-3340
AD-392731	UGCUUAUGACAUGAUCGCUUU	1325	3321-3341	AAAGCGAUCAUGUCAUAAGCAAU	1326	3319-3341
AD-392709	GCUUAUGACAUGAUCGCUUUC	1327	3322-3342	GAAAGCGAUCAUGUCAUAAGCAA	1328	3320-3342
AD-392723	CUUAUGACAUGAUCGCUUUCU	1329	3323-3343	AGAAAGCGAUCAUGUCAUAAGCA	1330	3321-3343
AD-392948	UUAUGACAUGAUCGCUUUCUA	1331	3324-3344	UAGAAAGCGAUCAUGUCAUAAGC	1332	3322-3344
AD-392724	UAUGACAUGAUCGCUUUCUAU	1333	3325-3345	AUAGAAAGCGAUCAUGUCAUAAG	1334	3323-3345
AD-392949	AUGACAUGAUCGCUUUCUACA	1335	3326-3346	UGUAGAAAGCGAUCAUGUCAUAA	1336	3324-3346
AD-392725	UGACAUGAUCGCUUUCUACAU	1337	3327-3347	AUGUAGAAAGCGAUCAUGUCAUA	1338	3325-3347
AD-392950	CAUGAUCGCUUUCUACACUGU	1339	3330-3350	ACAGUGTAGAAAGCGAUCAUGUC	1340	3328-3350
AD-392732	UGAUCGCUUUCUACACUGUAU	1341	3332-3352	AUACAGTGUAGAAAGCGAUCAUG	1342	3330-3352
AD-392726	GAUCGCUUUCUACACUGUAUU	1343	3333-3353	AAUACAGUGUAGAAAGCGAUCAU	1344	3331-3353
AD-392733	AUCGCUUUCUACACUGUAUUA	1345	3334-3354	UAAUACAGUGUAGAAAGCGAUCA	1346	3332-3354
AD-392906	UCGCUUUCUACACUGUAUUAU	1347	3335-3355	AUAAUACAGUGUAGAAAGCGAUC	1348	3333-3355
AD-392862	CGCUUUCUACACUGUAUUACA	1349	3336-3356	UGUAAUACAGUGUAGAAAGCGAU	1350	3334-3356
AD-392951	CUUUCUACACUGUAUUACAUA	1351	3338-3358	UAUGUAAUACAGUGUAGAAAGCG	1352	3336-3358

AD-392871	UUCUACACUGUAUUACAUAAA	1353	3340-3360	UUUAUGTAAUACAGUGUAGAAAG	1354	3338-3360
AD-392872	UCUACACUGUAUUACAUAAAU	1355	3341-3361	AUUUAUGUAAUACAGUGUAGAAA	1356	3339-3361
AD-392952	GAUUCAAUUUUCUUUAACCAU	1357	3456-3476	AUGGUUAAAGAAAAUUGAAUCUG	1358	3454-3476
AD-392907	AUUUUCUUUAACCAGUCUGAA	1359	3462-3482	UUCAGACUGGUUAAAGAAAAUUG	1360	3460-3482
AD-392953	UUUCUUUAACCAGUCUGAAGU	1361	3464-3484	ACUUCAGACUGGUUAAAGAAAAU	1362	3462-3484
AD-392741	UCUUUAACCAGUCUGAAGUUU	1363	3466-3486	AAACUUCAGACUGGUUAAAGAAA	1364	3464-3486
AD-392908	CUUUAACCAGUCUGAAGUUUC	1365	3467-3487	GAAACUTCAGACUGGUUAAAGAA	1366	3465-3487
AD-392977	CUGAAGUUUCAUUUAUGAUAU	1367	3478-3498	AUAUCATAAAUGAAACUUCAGAC	1368	3476-3498
AD-392847	GAAGUUUCAUUUAUGAUACAA	1369	3480-3500	UUGUAUCAUAAAUGAAACUUCAG	1370	3478-3500
AD-392809	AAAUGGAAGUGGCAAUAUAAU	1371	3511-3531	AUUAUATUGCCACUUCCAUUUUC	1372	3509-3531
AD-392810	AUGGAAGUGGCAAUAUAAGGU	1373	3513-3533	ACCUUATAUUGCCACUUCCAUUU	1374	3511-3533
AD-392777	UGCCUGGACAAACCCUUCUUU	1375	3547-3567	AAAGAAGGGUUUGUCCAGGCAUG	1376	3545-3567
AD-392960	UUCUUUUAAGAUGUGUCUUCA	1377	3562-3582	UGAAGACACAUCUUAAAAGAAGG	1378	3560-3582
AD-392873	CUUUUAAGAUGUGUCUUCAAU	1379	3564-3584	AUUGAAGACACAUCUUAAAAGAA	1380	3562-3584
AD-392889	UUUUAAGAUGUGUCUUCAAUU	1381	3565-3585	AAUUGAAGACACAUCUUAAAAGA	1382	3563-3585
AD-392954	UUUAAGAUGUGUCUUCAAUUU	1383	3566-3586	AAAUUGAAGACACAUCUUAAAAG	1384	3564-3586
AD-392955	UUAAGAUGUGUCUUCAAUUUG	1385	3567-3587	CAAAUUGAAGACACAUCUUAAAA	1386	3565-3587
AD-392909	UAAGAUGUGUCUUCAAUUUGU	1387	3568-3588	ACAAAUTGAAGACACAUCUUAAA	1388	3566-3588
AD-392710	AAGAUGUGUCUUCAAUUUGUA	1389	3569-3589	UACAAATUGAAGACACAUCUUAA	1390	3567-3589
AD-392956	AGAUGUGUCUUCAAUUUGUAU	1391	3570-3590	AUACAAAUUGAAGACACAUCUUA	1392	3568-3590
AD-392874	AUGUGUCUUCAAUUUGUAUAA	1393	3572-3592	UUAUACAAAUUGAAGACACAUCU	1394	3570-3592
AD-392957	UGUCUUCAAUUUGUAUAAAAU	1395	3575-3595	AUUUUATACAAAUUGAAGACACA	1396	3573-3595
AD-392958	CUUCAAUUUGUAUAAAAUGGU	1397	3578-3598	ACCAUUTUAUACAAAUUGAAGAC	1398	3576-3598
AD-392959	AUGGUGUUUUCAUGUAAAUAA	1399	3594-3614	UUAUUUACAUGAAAACACCAUUU	1400	3592-3614
AD-392788	GUAAAUAAAUACAUUCUUGGA	1401	3607-3627	UCCAAGAAUGUAUUUAUUUACAU	1402	3605-3627

Таблица 4. Скрининг с использованием однократной дозы для APP на первичных гепатоцитах яванского макака и линии клеток Be(2)C

Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК относительно ненацеливающегося контроля AD-1955

	Первичные гепатоциты яванского макака				Линия клеток Be(2)C			
Название дуплекса	**10 нМ, среднее**	**10 нМ, SD**	**0,1 нМ, среднее**	**0,1 нМ, SD**	**10 нМ, среднее**	**10 нМ, SD**	**0,1 нМ, среднее**	**0,1 нМ, SD**
AD-392853	92	5	89,9	1,5	97	2,5	99,3	8,8
AD-392857	86,7	3,3	98,9	6,1	85,1	4,4	103,8	5,9
AD-392851	90,5	1,5	97,9	10,1	100,1	4	103,9	7,8
AD-392811	90,5	10,5	87,8	2,5	89,1	6,8	98	5,1
AD-392910	52,3	3	99,2	32,4	66,1	6,1	101,3	9,7
AD-392890	57,4	4,8	108,5	23,1	63,9	1,5	100,3	10,6
AD-392911	16,4	3,4	85,7	4	10,6	3,5	71,2	10,3
AD-392912	16,7	2,7	84,8	4,5	9,7	1,7	57,7	4,1
AD-392778	46,1	19,2	96	23,4	7,9	0,9	82,4	7,4
AD-392727	52,9	5,8	98,9	11,4	48,3	4,5	94	5,7
AD-392728	43,8	20,3	91,5	10,2	17,6	2,2	86,2	6,5
AD-392891	52	7	142,2	35,1	34,8	1,7	93,5	5,8
AD-392822	53,9	3,8	75,2	2,9	30,1	3,2	83,7	5,8
AD-392749	46,3	11,7	97,6	2,6	14,9	1,7	95,7	5,3
AD-392794	108,8	17,9	86,9	2,7	92,9	7,9	87,4	6,7
AD-392795	39,5	13,2	78,1	11,8	15,5	1,8	79,9	7,9
AD-392812	87,2	4,3	90,4	2,5	79,8	3,3	78,5	13,8
AD-392796	48	17,6	82,6	2,8	17,1	2,5	80,2	3,5
AD-392779	100	30,9	95,9	4,8	99,6	4	98,6	3,3
AD-392780	80,7	29,5	93,2	4,5	47,4	4,4	101,6	5,2
AD-392813	91,6	2,9	85,1	4	84,8	4,7	88,9	7
AD-392797	98	6,6	88,7	11,1	79	3,3	84	12
AD-392761	73,9	18,4	94,2	4,3	77,9	4,4	101	6,4
AD-392814	56,9	2,9	84,4	5,4	47,5	2,6	83,8	6,6
AD-392742	89	21,9	99,4	8,2	48,1	5,8	96,6	3,7
AD-392750	110,7	44,7	99,9	13,2	25,4	1,2	95	4,7
AD-392823	65,5	3	73,7	2,9	38,8	4,1	84,9	3,8
AD-392789	103,7	4	105	3,8	88,1	7	79,5	4
AD-392781	81	39,1	94,9	5,8	21,2	3,1	95	8,9
AD-392798	119,2	16,3	85,3	10,9	73,1	6,3	83,2	7,4
AD-392751	48,5	12,9	93,9	7,9	15,6	3	87,2	2,5
AD-392858	90	1,5	95	2,6	90,7	4,7	103	7,7
AD-392844	21,8	0,4	93	3,6	6,2	0,6	51,8	5,3
AD-392842	88,9	0,5	98,2	1,6	67,7	4,1	102	2,7
AD-392848	91,7	9,1	90,1	2,6	70,9	7,5	96,5	16,7
AD-392838	68	3,6	90,2	3,3	20,2	2	84,3	6,2
AD-392839	69	2,6	84,8	3,9	62,7	3,1	85,8	7,6

AD-392734	103	32,4	112,8	23,5	86,6	6,6	98,6	3,1
AD-392790	34	4,8	99,2	1,2	10,9	1,4	72,6	2,5
AD-392815	37,4	1,7	82,5	2,9	21,5	1,9	79,8	0,9
AD-392762	72,2	21,3	95	12,3	91,2	4,6	102,6	7,7
AD-392735	47	9,7	101,5	9,2	29,6	4,4	94	7,4
AD-392743	73,6	23,4	105,5	16,6	58,5	2,6	100,1	11,3
AD-392736	50,5	9	97,3	8,2	19,6	2,4	91,7	7
AD-392824	22,6	6,7	65,8	4,9	6,4	1,6	54,9	5
AD-392799	90,1	23,6	75,8	4,5	35,7	5,4	78,2	7,5
AD-392971	89,2	13,4	92,1	0,3	57,1	3,6	91,8	5,8
AD-392913	18,4	2,7	78,1	8	7,4	0,2	45,7	2,1
AD-392892	61	12,4	113,2	8,6	57,4	5,4	89,7	13,2
AD-392914	80,3	6,3	103,2	5,9	86,5	3,4	111,4	19,7
AD-392860	91,8	4,8	89,4	6,1	106,1	6,2	98,6	5,6
AD-392875	96,2	4,8	107,9	2,5	66,1	2,9	83,5	8,4
AD-392915	48,1	1,8	101,9	4,8	38,3	3,4	103	5,4
AD-392782	109,4	4,8	95,4	5,3	72,2	4,3	101,6	2,7
AD-392763	60	17,6	93	6,3	26,7	2,2	91,6	3,8
AD-392816	40,2	1,5	74,6	2,2	15,6	1,2	78,9	2,4
AD-392704	28,7	12,1	94,1	6,8	15,8	1,5	65,7	9,7
AD-392854	89	3,5	84,9	2,9	99	7	97,9	5,8
AD-392856	93,7	2,5	88,4	2,8	101	7,8	94,2	3,5
AD-392817	101,6	3	85	5,2	77,5	11,4	98,6	11,6
AD-392764	69,5	12,1	87,2	5,9	10,6	1,4	79,4	5,7
AD-392845	89,5	2	99	8,2	50,4	5	90,5	2,9
AD-392825	38,1	2,5	98	8,4	14,7	4,7	91,4	4
AD-392849	89,4	4,1	92,3	11,4	30,3	2,3	103,4	7,4
AD-392846	83,1	1,9	99,7	6,3	17,6	3,2	77,7	4,2
AD-392859	82	2,5	91,4	5,5	69,7	1,5	98,6	2,1
AD-392843	18,8	2,1	88,9	5,4	7,4	2,5	37,2	2,2
AD-392855	64	5,2	85,9	12,4	23,4	2,6	85,6	9,1
AD-392840	74,3	2,3	91,2	6,4	27,7	2,5	94,3	15,6
AD-392835	18,2	2,3	84,3	5,4	12,7	3,1	53,5	4,5
AD-392729	46,9	13,7	100,9	20,5	13,3	2,3	82,4	4,2
AD-392916	20	1,6	63,7	3,6	7,5	2	44,4	2,1
AD-392876	45,8	4,6	100,8	2,6	16,4	3,6	67,4	7,2
AD-392861	91,9	3,9	89,3	2,6	89,9	10,9	91,5	4,3
AD-392863	22,8	0,6	90,1	9,3	9,9	1,9	72,2	8
AD-392917	30,6	1,8	99,7	2,1	21,7	3,5	82,5	7,5
AD-392783	22,8	1,7	90,4	11,1	13,1	1,4	69,8	5,7
AD-392765	79	22	83,3	6,4	22,4	2,8	68,1	5,7
AD-392791	31,9	7,6	84,1	4,8	11,2	1,2	52,3	2,4
AD-392800	38,2	3,6	72,3	7,6	8	1,5	65,4	7,2
AD-392711	38,1	24,1	115,1	21	18,8	0,6	67,2	2,2
AD-392801	18,7	0,6	87	6,3	11,7	3	66,3	17,5
AD-392826	69	4,6	95,1	10	31,9	3,3	88,4	8
AD-392818	31,5	2,2	77,8	6,6	18,6	3	80,7	6,2
AD-392792	35,8	6,7	87,7	4,1	10,7	1,1	58,3	4,7

AD-392802	43,8	4,1	81,8	7,5	26,5	3,7	90,3	2,6
AD-392766	32,8	11,5	75,2	4,1	8,4	2	38,1	3,5
AD-392767	64	23,5	87,5	5,2	10,7	1,5	66,1	5,8
AD-392834	84,6	2,8	85,1	6,9	7,8	0,8	68,1	4,7
AD-392974	118,3	5,4	105,4	6,3	9,3	0,9	53,1	4,5
AD-392784	63,6	14,9	92,8	0,8	28,1	3,4	96,7	6,5
AD-392744	59,6	17,2	96,6	7,4	18,3	1	92,7	7,7
AD-392752	38,2	11,6	92,8	4,9	7,7	1,2	57,6	2,3
AD-392737	44,8	38,6	103,9	27,2	9,7	0,7	57,3	3,4
AD-392712	73	38,4	102,8	6,1	37,2	1,9	67,4	16
AD-392705	25,2	9,4	88,7	4,3	6,6	0,9	47,7	6,3
AD-392713	81,8	33,4	101,1	7,3	61,7	5,8	92,7	9,8
AD-392918	25,1	1,8	93,5	5,3	18,5	1	95	11,2
AD-392919	24,3	3,3	95	8,6	13,8	4	78	9,1
AD-392803	51,5	3,1	89,5	9,4	19,8	2	72	3
AD-392804	72	3,3	97,2	11,3	22,9	1,2	83,1	3,2
AD-392827	24,1	1,5	87	9,2	11,7	1,7	72,7	5,9
AD-392828	67,5	3,7	102,4	13,8	33,7	3,2	81,9	3,9
AD-392785	39,5	14,4	70,2	15	5,6	1,2	37,4	3,9
AD-392829	26,5	2,8	87,5	7,5	16,1	1,6	73	7,4
AD-392920	35,8	3,5	108,1	4,7	19,9	4,3	94,4	6,7
AD-392921	30	3,8	100,7	9,1	11,9	2,8	75	7,6
AD-392768	66,5	21,9	94,1	6,6	13,1	2,7	84,9	5,8
AD-392805	20,5	0,9	88,7	13,4	7,9	2,2	43,5	3,9
AD-392769	41,9	21,5	74,6	4,6	4,9	2,1	32,5	3,9
AD-392753	40,4	7,6	113,9	21,9	12,5	0,9	72,5	7,6
AD-392714	21,7	8,1	99,5	7,2	6,9	0,8	40,8	3,2
AD-392703	17,6	1,5	90,5	6,9	6,2	1,4	37,7	3,9
AD-392715	25,5	10,3	78,8	4,8	6,4	1,7	38,9	2,7
AD-392841	89,6	3,9	93,6	9	36,8	4,1	96,6	6,9
AD-392836	88,5	1,6	97,7	8,6	7,6	2	51,5	2
AD-392966	71,5	4,6	92,4	3,4	6,4	1	47,6	4,2
AD-392832	94,7	7,9	85,4	14,4	23,8	3,2	76,2	2,6
AD-392972	84,1	10,8	89,8	7,1	8,3	2	57,1	3,5
AD-392961	82,6	7,5	111,3	9,9	8	0,4	51,7	5,1
AD-392967	81,6	7,1	93,2	6,8	20,2	1,6	89,4	4,9
AD-392893	64,8	11,7	118,8	19,7	59,9	2,6	80,7	5,1
AD-392894	68,4	10,3	111,4	10,8	21,9	1,5	88,4	15,6
AD-392864	62,7	15,4	88,4	6,2	8,2	0,8	55,9	4,5
AD-392865	45,8	2,4	103,8	12,6	13,6	3,1	35,8	5,4
AD-392922	43,3	5	106,5	2,2	11,1	5,2	53,1	4,9
AD-392833	95,1	5,1	93,9	4,1	21,2	0,7	86,2	0,8
AD-392968	54,3	3,1	94,8	9,3	8,2	0,7	51,9	2,5
AD-392962	82,3	10,9	103	10	8,5	0,5	55	3,8
AD-392963	63,9	8,9	99,6	10,3	19,5	0,5	71,2	1,1
AD-392964	94,4	8,6	97,5	9,2	52,4	3,7	87,1	2,8
AD-392969	73,3	6,6	99	6,2	11,7	1,1	69,4	2,5
AD-392973	69	12,8	87,7	8	7,6	0,7	67,3	1,7

AD-392923	28,6	3,3	106	8,2	13,2	3,5	69,6	12,7
AD-392866	18	4,3	86,5	14,1	9,1	0,8	29,1	8,6
AD-392924	79,7	3,1	108,3	5,2	89	3,1	94,8	7,7
AD-392895	63,4	13,8	109	4,4	31,6	2,9	86,7	8,9
AD-392867	95,2	11,6	99,8	15,8	45,3	1,7	77,1	6,6
AD-392877	74,8	23,6	102,2	7,6	14,3	2	54,1	1,7
AD-392707	27,1	7,6	87,9	5,5	6	1,4	68,8	1,9
AD-392716	107,6	19,9	100,9	7,9	45,4	4	94,6	3,6
AD-392925	47	5,6	106,8	5,1	23,1	2,4	80,7	9,3
AD-392926	22,1	2,5	93,7	8,7	7,7	0,7	67	9,8
AD-392927	18,2	5,4	80,1	8,7	9,7	2	44,2	6,4
AD-392717	57,4	16	84,6	9,4	8,7	0,9	52,2	3,7
AD-392928	71,3	4	95,4	4,1	35,3	2,7	103	8,5
AD-392700	23	7,6	88,4	4,8	6,3	0,6	45,3	10,7
AD-392878	29,9	18,4	89	4,4	8,4	1,6	34,5	4
AD-392718	40,3	14,5	105,4	25,7	10,8	0,6	68,5	2,3
AD-392929	42,4	3,7	99,5	1,2	15	4,9	88,8	14,1
AD-392879	102,2	14,5	97,7	3,5	59,6	3	67,3	8,1
AD-392754	97,1	14,7	102,1	17,6	27,3	2,5	108,6	5,7
AD-392819	22,3	2,2	79,6	4,9	11	2,5	58,4	4,9
AD-392745	13,8	2,2	74	13,1	7,1	1,9	28,2	4
AD-392770	36,9	18	80,3	8,1	6,7	1	34,1	4,1
AD-392806	44,9	3,3	84,2	3,9	17,7	2,6	54,3	1,9
AD-392771	49,4	18,6	89,4	1,6	9,5	0,4	60,1	2,9
AD-392820	54,4	3,3	88,1	3,9	19,6	1,1	78,1	6,4
AD-392821	61,1	2,2	79,8	3,1	15,5	1,6	80,1	5,3
AD-392786	72,2	9,8	109,4	4	19,8	1,9	65,3	2,2
AD-392772	58,9	11,7	88,9	2,6	11	0,6	62,2	3,1
AD-392699	37,9	9,1	102,9	8,7	8,1	3,4	55,6	4,4
AD-392868	52,9	1,4	95,8	11,1	18	1,8	61,5	4,3
AD-392719	37,4	20,3	94,7	12,4	7,3	1	38,9	2,4
AD-392880	21,9	2	83,2	3	10,9	1,5	32,7	3,3
AD-392930	31,4	2,5	95,8	2	9,9	2,4	42,2	6
AD-392931	75,2	7,7	98,4	4,5	44,3	4,1	108,6	12,5
AD-392932	34,7	5,5	99,6	4,9	12,2	0,8	54,5	5,1
AD-392869	21,4	1,8	92,5	12,4	6,9	1,6	29	2
AD-392870	22,1	3,8	86	13,5	9	1,2	20,7	1,6
AD-392896	50,7	6,7	112,8	8,3	21,9	3	75,9	9,4
AD-392787	100,4	6,1	114,6	11,3	54,7	3,4	61,6	28,7
AD-392720	61,7	30	87,6	4,6	6,6	0,2	34,6	4
AD-392746	54,4	23,1	102,1	22,9	5,7	0,7	59	6,3
AD-392773	101,8	22	97,6	6,3	30,3	1,5	97,4	6
AD-392807	56	3,3	76	4,9	11,2	1,4	64,2	4,3
AD-392730	53,3	8,2	102,8	22,2	28,4	1,9	91,9	5,4
AD-392721	43,9	21,8	93,3	6,7	7,4	0,1	58,1	1,5
AD-392933	51,7	6,2	88,8	3,3	22	4,4	86,3	7,8
AD-392934	71,4	7,1	100,9	5,6	53,7	3,7	100,1	14
AD-392881	34,6	2	104,5	1,5	11	3,9	55	11

AD-392897	47,9	5	103,3	2,7	19,2	1,9	91,7	7,3
AD-392898	24,7	4,3	98,9	6,7	11,6	2,4	76,1	11,5
AD-392708	79,7	6,2	99,5	3,8	57,8	2,5	95,7	6,3
AD-392899	20,7	3,4	75	4,2	12,6	3	57,9	5,9
AD-392935	25,8	2,6	85,8	2,4	9,5	1,6	44	8
AD-392882	47,9	2	101,9	4,4	15,9	2,3	77,6	9,3
AD-392738	43,3	10,3	98,8	7,3	9,7	1,4	88	4
AD-392739	42,8	13,3	124,4	28	16,6	0,8	82,1	4,9
AD-392936	26,9	3,9	91,3	2,5	11,7	0,6	45,7	11,4
AD-392900	36,6	1,9	96,1	5,9	11,7	1,5	64,5	4,1
AD-392901	49	0,9	106,8	6,4	46,2	4,3	81,8	7,1
AD-392937	36,7	2,7	89,6	3	12,4	1,4	53	7,9
AD-392883	30,8	2,2	96,6	4,4	8,5	1,2	55,2	3,5
AD-392975	112,8	2,1	106,9	2,2	27,9	1,3	95,3	5,5
AD-392938	33	7,9	88,1	3,2	13,2	2,9	61,6	6,9
AD-392755	100,8	38	105,8	17,6	38,6	2,2	93,2	5,9
AD-392939	36,8	8	96,2	4,8	9,8	3	59,1	9,1
AD-392940	81,3	12,4	97	3,1	84,6	8,1	93,8	7,5
AD-392756	101,7	14,9	94,9	5,7	43,2	4,2	98,9	11,3
AD-392774	99,6	34,8	97,3	2,2	87,9	3,8	98,6	7,7
AD-392850	89,3	3,3	95,3	4,2	37,4	3,2	102,2	11,6
AD-392852	91,8	4,8	88,2	5,9	59,9	5,6	103,8	8,7
AD-392830	89,2	1,9	83,6	9,6	68,2	2,5	89,6	3,7
AD-392808	44,2	17,6	76,1	6,5	9,1	1,1	67,3	3,3
AD-392793	72	2,1	84,9	2	33	3,4	68	19,8
AD-392757	71,3	28,8	98,5	1,7	24,4	1	87,5	5,9
AD-392747	86,8	27,4	99,9	7,2	33,1	0,9	97,6	4,3
AD-392902	29,3	3,3	134,2	36,1	17,9	1,7	87	6,6
AD-392941	36,9	13,1	82,5	5,4	13,3	1,4	70,6	13,1
AD-392942	22	3,6	89,2	5,2	6,5	0,8	56,2	4,4
AD-392943	28	4,2	95,1	4,5	11,3	1,5	57	6,2
AD-392944	27,9	3,5	85,8	4,4	12,9	0,6	53,4	4,1
AD-392903	16,4	1	76,8	2,7	7,9	1,1	29	9,1
AD-392775	61,4	30,1	91,8	4,8	15	0,7	85,1	5,4
AD-392758	53,8	35,1	83,4	8	11,1	0,9	51,6	6,6
AD-392945	33,3	4,7	101,9	4,9	10,6	1	76,2	3,7
AD-392946	71	6,7	99,6	3,1	39,7	2	90,3	4,5
AD-392884	30,2	1,9	90,5	8	10,8	2,3	53,3	2,9
AD-392947	51,8	6	95,8	1,8	12,4	0,7	68,4	3
AD-392748	84,5	29,8	114	35,3	27,9	1,8	92,7	18,9
AD-392759	87,4	36,2	96,7	8,4	22,7	2,7	97	7,7
AD-392837	37,8	0,6	91,9	4,6	7,9	2,4	36,9	1,6
AD-392970	84,2	7,5	93,4	4,1	7,5	1	41,3	4,2
AD-392976	112,8	16,8	112,7	5,3	19,8	1,4	84,1	1,7
AD-392965	82,2	14,1	96,1	5,9	8,2	1	54,3	1,8
AD-392831	87,9	4,2	82	12,3	12,6	2,8	55,5	5,9
AD-392904	74,2	2,8	105,9	7,1	26	3	102,4	14,2
AD-392885	30,3	3,2	82,9	6	5,5	1,6	29,9	3,8

AD-392886	26,6	3,3	87,3	2,6	9,7	2,2	40,1	4,5
AD-392776	60,2	17	95,7	8,6	9,4	1,5	69,4	6,5
AD-392887	20,8	3,3	102,3	11,9	8,1	2	34,5	4,7
AD-392722	68,7	26,2	95,3	4,1	12,3	2,1	73,8	2,3
AD-392740	93,3	22,3	94,2	5,3	50,7	2,6	100,4	8,3
AD-392760	68,1	23	96,7	5,6	8,5	0,5	57,3	5,9
AD-392731	39,8	10,9	99,6	12,7	4,5	2,5	41,1	11,1
AD-392709	74,4	24,7	107,4	13,6	11,8	0,7	78,2	5,3
AD-392723	58,8	23,6	119,7	22,1	14,2	3,1	72,1	3,9
AD-392948	32,8	7,4	84,3	2,3	6,5	0,5	33	2,3
AD-392724	59,7	13,5	93,8	7,2	13	1,6	58,3	5,5
AD-392949	49	2,8	92,9	2	15,8	1,7	70,8	2,6
AD-392725	40,2	6,5	95,7	5,9	10	2,8	54,4	2,5
AD-392950	25,1	4,1	83,7	5,5	8,2	0,9	50,2	3,9
AD-392732	27,6	5,2	92,4	16,7	7,4	1,1	30,6	1,5
AD-392726	57,8	9,3	96	4,8	9	0,6	70	5,9
AD-392733	79,3	18	92,3	5	40,3	1,9	96,6	7,5
AD-392906	75,4	3,6	104,5	2,1	37,2	4	107	18,3
AD-392862	33,1	2,3	84,5	4,2	10,7	2	54	5,2
AD-392951	41	6,5	94,1	8	13,4	0,5	70,5	4,1
AD-392871	46,6	11,3	95,8	14,3	12,2	1,8	35,7	5,2
AD-392872	69,6	11	92	7,4	17,5	3	55,4	6,7
AD-392952	74,8	6,9	101,1	5,8	73	4,1	94,5	4,3
AD-392907	74,8	4,4	99,4	4,5	71,4	6,2	102,2	16,2
AD-392953	79,5	5,3	101,7	4,3	72,4	3,5	90,6	3,7
AD-392741	85	16,2	93,1	4,3	90,3	5,6	97	5,7
AD-392908	71,7	5	105,4	2,3	72,2	1,6	95	9
AD-392977	93,7	7,9	111,3	3,2	68	2,7	80,1	2,5
AD-392847	92,1	1,9	97,9	1,8	82,4	5	85,7	8,1
AD-392809	93,5	7	93,9	10	81,9	7,5	83,3	5,7
AD-392810	93	6,1	88,8	5,9	76,9	5,4	90,6	2,9
AD-392777	88,2	20,1	92,7	7,2	86	5	101,9	13
AD-392960	85	8,7	103,7	8,7	73	3,8	87	6
AD-392873	95,5	2,9	95,5	5,6	76,4	3,7	49,1	15,4
AD-392889	64,1	5,5	126,2	36,5	71,1	4,8	85,6	7,4
AD-392954	68,9	7,2	98,1	6	66,7	3,5	75,1	4,3
AD-392955	83	3,1	98,6	5,7	73,6	1,3	88,6	2,9
AD-392909	61,4	4,4	101,1	5,8	67,3	4,7	85,8	10,4
AD-392710	110	29,8	165,2	53,6	66,7	3,8	86	9,1
AD-392956	71,5	9,3	93,1	3,8	63,5	4,5	78,9	2,7
AD-392874	77,2	2,9	98,8	4,1	67,5	9,5	64,9	15,1
AD-392957	59,5	10,6	98,9	19	60,5	4,8	72,4	2
AD-392958	80,4	5,5	95,9	8,2	83,3	5	102,9	6,3
AD-392959	67,6	6,5	99	6,1	75,9	3,1	89,4	3,3
AD-392788	106,7	6	111,9	9,1	92,1	4	87,4	6,6

Установили определенные группы средств, находящихся в участках с особенно эффективным нацеливанием для осуществления нокдауна APP. Как показано в

приведенных выше результатах, некоторые участки транскрипта APP, по-видимому, являются относительно более восприимчивы к нацеливанию средств для RNAi по настоящему изобретению, чем другие участки, например, средства, которые нацеливаются на положения 2639-2689 в последовательности APP NM_000484 (т. е. средства для RNAi AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703 и AD-392715), продемонстрировали особенно устойчивые результаты нокдауна в линии клеток Be(2)C, что указывает на возможную «горячую точку» с вероятной подобной активностью других перекрывающихся средств для RNAi, нацеливающихся на эти положения транскрипта APP. Следовательно явно предполагается, что любые средства для RNAi, имеющие целевые последовательности, которые полностью находятся в пределах следующих диапазонов положений NM_000484, вероятно, будут проявлять устойчивый ингибирующий эффект в отношении APP: положения 1891-1919 APP NM_00484; положения 2282-2306 APP NM_00484; положения 2464-2494 APP NM_00484; положения 2475-2638 APP NM_00484; положения 2621-2689 APP NM_00484; положения 2682-2725 APP NM_00484; положения 2705-2746 APP NM_00484; положения 2726-2771 APP NM_00484; положения 2754-2788 APP NM_00484; положения 2782-2813 APP NM_00484; положения 2801-2826 APP NM_00484; положения 2847-2890 APP NM_00484; положения 2871-2896 APP NM_00484; положения 2882-2960 APP NM_00484; положения 2942-2971 APP NM_00484; положения 2951-3057 APP NM_00484; положения 3172-3223 APP NM_00484; положения 3209-3235 APP NM_00484; положения 3256-3289 NM_00484; положения 3302-3338 NM_00484; положения 3318-3353 APP NM_00484 и положения 3334-3361 APP NM_00484.

Таблица 5A. Модифицированные последовательности APP мыши

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397175	csasugu(Uhd)CfuGfUfGfguaaacucaaL96	1403	VPusUfsgagUfuUfAfccacAfgAfacaugsgsc	1404	GCCAUGUUCUGUGGUAAACUCAA	1405
AD-397176	usgsuuc(Uhd)GfuGfGfUfaaacucaacaL96	1406	VPusGfsuugAfgUfUfuaccAfcAfgaacasusg	1407	CAUGUUCUGUGGUAAACUCAACA	1408
AD-397177	asusguu(Chd)UfgUfGfGfuaaacucaaaL96	1409	VPusUfsugaGfuUfUfaccaCfaGfaacausgsg	1410	CCAUGUUCUGUGGUAAACUCAAC	1411
AD-397178	csusgug(Ghd)UfaAfAfCfucaacaugcaL96	1412	VPusGfscauGfuUfGfaguuUfaCfcacagsasa	1413	UUCUGUGGUAAACUCAACAUGCA	1414
AD-397179	gsgsuaa(Ahd)CfuCfAfAfcaugcacauaL96	1415	VPusAfsuguGfcAfUfguugAfgUfuuaccsasc	1416	GUGGUAAACUCAACAUGCACAUG	1417
AD-397180	usgsugg(Uhd)AfaAfCfUfcaacaugcaaL96	1418	VPusUfsgcaUfgUfUfgaguUfuAfccacasgsa	1419	UCUGUGGUAAACUCAACAUGCAC	1420
AD-397181	gsasaga(Ghd)CfaCfUfAfacuugcacgaL96	1421	VPusCfsgugCfaAfGfuuagUfgCfucuucsusc	1422	GAGAAGAGCACUAACUUGCACGA	1423
AD-397182	cscsgcu(Ghd)GfuAfCfUfuugaugucaaL96	1424	VPusUfsgacAfuCfAfaaguAfcCfagcggsgsa	1425	UCCCGCUGGUACUUUGAUGUCAC	1426
AD-397183	cscsaug(Uhd)UfcUfGfUfgguaaacucaL96	1427	VPusGfsaguUfuAfCfcacaGfaAfcauggscsg	1428	CGCCAUGUUCUGUGGUAAACUCA	1429
AD-397184	gsusggu(Ahd)AfaCfUfCfaacaugcacaL96	1430	VPusGfsugcAfuGfUfugagUfuUfaccacsasg	1431	CUGUGGUAAACUCAACAUGCACA	1432
AD-397185	gsasacu(Ghd)CfaGfAfUfcacaaacguaL96	1433	VPusAfscguUfuGfUfgaucUfgCfaguucsasg	1434	CUGAACUGCAGAUCACAAACGUG	1435
AD-397186	asasgag(Chd)AfcUfAfAfcuugcacgaaL96	1436	VPusUfscguGfcAfAfguuaGfuGfcucuuscsu	1437	AGAAGAGCACUAACUUGCACGAC	1438
AD-397187	asgscac(Uhd)AfaCfUfUfgcacgacuaaL96	1439	VPusUfsaguCfgUfGfcaagUfuAfgugcuscsu	1440	AGAGCACUAACUUGCACGACUAU	1441
AD-397188	gscsacu(Ahd)AfcUfUfGfcacgacuauaL96	1442	VPusAfsuagUfcGfUfgcaaGfuUfagugcsusc	1443	GAGCACUAACUUGCACGACUAUG	1444
AD-397189	asasagu(Uhd)UfaCfUfCfaagacuaccaL96	1445	VPusGfsguaGfuCfUfugagUfaAfacuuusgsg	1446	CCAAAGUUUACUCAAGACUACCA	1447
AD-397190	csgscau(Ghd)AfaCfCfAfgucucugucaL96	1448	VPusGfsacaGfaGfAfcuggUfuCfaugcgscsu	1449	AGCGCAUGAACCAGUCUCUGUCC	1450
AD-397191	csascau(Chd)GfuGfAfUfuccuuaccgaL96	1451	VPusCfsgguAfaGfGfaaucAfcGfaugugsgsg	1452	CCCACAUCGUGAUUCCUUACCGU	1453
AD-397192	asusgcu(Ghd)AfaGfAfAfguacguccgaL96	1454	VPusCfsggaCfgUfAfcuucUfuCfagcausgsu	1455	ACAUGCUGAAGAAGUACGUCCGU	1456
AD-397193	gsasgcg(Chd)AfuGfAfAfccagucucuaL96	1457	VPusAfsgagAfcUfGfguucAfuGfcgcucsgsu	1458	ACGAGCGCAUGAACCAGUCUCUG	1459
AD-397194	gsasgca(Ghd)AfaCfUfAfcuccgacgaaL96	1460	VPusUfscguCfgGfAfguagUfuCfugcucscsu	1461	AGGAGCAGAACUACUCCGACGAU	1462
AD-397195	csasccc(Ahd)CfaUfCfCfgfugauuccuuaL96	1463	VPusAfsaggAfaUfCfacgaUfgUfgggugsusg	1464	CACACCCACAUCGUGAUUCCUUA	1465
AD-397196	asgsagc(Ahd)CfuAfAfCfuugcacgacaL96	1466	VPusGfsucgUfgCfAfaguuAfgUfgcucususc	1467	GAAGAGCACUAACUUGCACGACU	1468
AD-397197	csascua(Ahd)CfuUfGfCfacgacuaugaL96	1469	VPusCfsauaGfuCfGfugcaAfgUfuagugscsu	1470	AGCACUAACUUGCACGACUAUGG	1471
AD-397198	csuscaa(Ghd)AfcUfAfCfcagugaaccaL96	1472	VPusGfsguuCfaCfUfgguaGfuCfuugagsusa	1473	UACUCAAGACUACCAGUGAACCU	1474
AD-397199	asgscac(Ahd)CfcCfUfAfaagcauuuuaL96	1475	VPusAfsaaaUfgCfUfuuagGfgUfgugcusgsu	1476	ACAGCACACCCUAAAGCAUUUUG	1477

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397200	asasgga(Ghd)CfaGfAfAfcuacuccgaaL96	1478	VPusUfscggAfgUfAfguucUfgCfuccuuscsu	1479	AGAAGGAGCAGAACUACUCCGAC	1480
AD-397201	gsgsagc(Ahd)GfaAfCfUfacuccgacgaL96	1481	VPusCfsgucGfgAfGfuaguUfcUfgcuccsusu	1482	AAGGAGCAGAACUACUCCGACGA	1483
AD-397202	gsasaac(Ahd)GfuAfCfAfcauccauccaL96	1484	VPusGfsgauGfgAfUfguguAfcUfguuucsusu	1485	AAGAAACAGUACACAUCCAUCCA	1486
AD-397203	csusgaa(Chd)UfgCfAfGfaucacaaacaL96	1487	VPusGfsuuuGfuGfAfucugCfaGfuucagsgsg	1488	CCCUGAACUGCAGAUCACAAACG	1489
AD-397204	cscsaca(Uhd)CfgUfGfAfuuccuuaccaL96	1490	VPusGfsguaAfgGfAfaucaCfgAfuguggsgsu	1491	ACCCACAUCGUGAUUCCUUACCG	1492
AD-397205	gsusgcc(Chd)GfaCfAfAfgugcaaguuaL96	1493	VPusAfsacuUfgCfAfcuugUfcGfggcacsgsa	1494	UCGUGCCCGACAAGUGCAAGUUC	1495
AD-397206	gsascua(Chd)CfaGfUfGfaaccucuucaL96	1496	VPusGfsaagAfgGfUfucacUfgGfuagucsusu	1497	AAGACUACCAGUGAACCUCUUCC	1498
AD-397207	gsusccg(Chd)CfaUfCfAfaaaacugguaL96	1499	VPusAfsccaGfuUfUfuugaUfgGfcggacsusu	1500	AAGUCCGCCAUCAAAAACUGGUG	1501
AD-397208	gsgscccc(Uhd)CfgAfGfAfauuacaucaaL96	1502	VPusUfsgauGfuAfAfuucuCfgAfgggccsasg	1503	CUGGCCCUCGAGAAUUACAUCAC	1504
AD-397209	csasugc(Uhd)GfaAfGfAfaguacguccaL96	1505	VPusGfsgacGfuAfCfuucuUfcAfgcaugsusu	1506	AACAUGCUGAAGAAGUACGUCCG	1507
AD-397210	usgscug(Ahd)AfgAfAfGfuacguccguaL96	1508	VPusAfscggAfcGfUfacuuCfuUfcagcasusg	1509	CAUGCUGAAGAAGUACGUCCGUG	1510
AD-397211	uscscgc(Chd)AfuCfAfAfaaacuggugaL96	1511	VPusCfsaccAfgUfUfuuugAfuGfgcggascsu	1512	AGUCCGCCAUCAAAAACUGGUGU	1513
AD-397212	ususgca(Chd)GfaCfUfAfuggcaugcuaL96	1514	VPusAfsgcaUfgCfCfauagUfcGfugcaasgsu	1515	ACUUGCACGACUAUGGCAUGCUG	1516
AD-397213	uscscca(Ghd)GfuCfAfUfgagagaaugaL96	1517	VPusCfsauuCfuCfUfcaugAfcCfugggascsa	1518	UGUCCCAGGUCAUGAGAGAAUGG	1519
AD-397214	csusgaa(Ghd)AfaGfUfAfcguccgugcaL96	1520	VPusGfscacGfgAfCfguacUfuCfuucagscsa	1521	UGCUGAAGAAGUACGUCCGUGCG	1522
AD-397215	csgsugu(Ghd)AfuCfUfAfcgagcgcauaL96	1523	VPusAfsugcGfcUfCfguagAfuCfacacgsgsa	1524	UCCGUGUGAUCUACGAGCGCAUG	1525
AD-397216	usascug(Chd)CfaAfGfAfggucuacccaL96	1526	VPusGfsgguAfgAfCfcucuUfgGfcaguascsu	1527	AGUACUGCCAAGAGGUCUACCCU	1528
AD-397217	csascCg(Ahd)GfaGfAfGfaaugucccaaL96	1529	VPusUfsgggAfcAfUfucucUfcUfcggugscsu	1530	AGCACCGAGAGAGAAUGUCCCAG	1531
AD-397218	csasagg(Chd)CfuCfAfUfcauguguucaL96	1532	VPusGfsaacAfcAfUfgaugAfgGfccuugsgsg	1533	CCCAAGGCCUCAUCAUGUGUUCA	1534
AD-397219	gscsuga(Ahd)GfaAfGfUfacguccgugaL96	1535	VPusCfsacgGfaCfGfuacuUfcUfucagcsasu	1536	AUGCUGAAGAAGUACGUCCGUGC	1537
AD-397220	asasgca(Uhd)UfuUfGfAfacaugugcgaL96	1538	VPusCfsgcaCfaUfGfuucaAfaAfugcuususa	1539	UAAAGCAUUUUGAACAUGUGCGC	1540
AD-397221	csascCu(Chd)CfgUfGfUfgaucuacgaaL96	1541	VPusUfscguAfgAfUfcacaCfgGfaggugsusg	1542	CACACCUCCGUGUGAUCUACGAG	1543
AD-397222	gsasagg(Ahd)GfcAfGfAfacuacuccgaL96	1544	VPusCfsggaGfuAfGfuucuGfcUfccuucsusg	1545	CAGAAGGAGCAGAACUACUCCGA	1546
AD-397223	gsasaga(Ahd)AfcAfGfUfacacauccaaL96	1547	VPusUfsggaUfgUfGfuacuGfuUfucuucsusu	1548	AAGAAGAAACAGUACACAUCCAU	1549
AD-397224	gsusacu(Ghd)CfcAfAfGfaggucuaccaL96	1550	VPusGfsguaGfaCfCfucuuGfgCfaguacsusg	1551	CAGUACUGCCAAGAGGUCUACCC	1552
AD-397225	ascsugc(Chd)AfaGfAfGfgucuacccuaL96	1553	VPusAfsgggUfaGfAfccucUfuGfgcagusasc	1554	GUACUGCCAAGAGGUCUACCCUG	1555

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397226	ascsuaa(Chd)UfuGfCfAfcgacuauggaL96	1556	VPusCfscauAfgUfCfgugcAfaGfuuagusgsc	1557	GCACUAACUUGCACGACUAUGGC	1558
AD-397227	gsusccc(Ahd)UfuCfUfUfuuacggcggaL96	1559	VPusCfscgcCfgUfAfaaagAfaUfgggacsasc	1560	GUGUCCCAUUCUUUUACGGCGGA	1561
AD-397228	asasgcu(Ghd)AfcAfAfGfaaggccguuaL96	1562	VPusAfsacgGfcCfUfucuuGfuCfagcuususg	1563	CAAAGCUGACAAGAAGGCCGUUA	1564
AD-397229	usgsaca(Ahd)GfaAfGfGfccguuauccaL96	1565	VPusGfsgauAfaCfGfgccuUfcUfugucasgsc	1566	GCUGACAAGAAGGCCGUUAUCCA	1567
AD-397230	asgscau(Uhd)UfuGfAfAfcaugugcgcaL96	1568	VPusGfscgcAfcAfUfguucAfaAfaugcususu	1569	AAAGCAUUUUGAACAUGUGCGCA	1570
AD-397231	usgsuga(Uhd)CfuAfCfGfagcgcaugaaL96	1571	VPusUfscauGfcGfCfucguAfgAfucacascsg	1572	CGUGUGAUCUACGAGCGCAUGAA	1573
AD-397233	csasgcg(Ahd)GfaAfGfAfgcacuaacuaL96	1574	VPusAfsguuAfgUfGfcucuUfcUfcgcugcsca	1575	UGCAGCGAGAAGAGCACUAACUU	1576
AD-397234	asgscgu(Ghd)UfcAfAfCfccaaaguuuaL96	1577	VPusAfsaacUfuUfGfgguuGfaCfacgcusgsc	1578	GCAGCGUGUCAACCCAAAGUUUA	1579
AD-397235	usgsuca(Ahd)CfcCfAfAfaguuuacucaL96	1580	VPusGfsaguAfaAfCfuuugGfgUfugacascsg	1581	CGUGUCAACCCAAAGUUUACUCA	1582
AD-397236	usgsucc(Chd)AfuUfCfUfuuuacggcgaL96	1583	VPusCfsgccGfuAfAfaagaAfuGfggacascsa	1584	UGUGUCCCAUUCUUUUACGGCGG	1585
AD-397237	gsusguc(Ahd)AfcCfCfAfaaguuuacuaL96	1586	VPusAfsguaAfaCfUfuuggGfuUfgacacsgsc	1587	GCGUGUCAACCCAAAGUUUACUC	1588
AD-397238	asasgau(Chd)CfuGfAfUfaaacuucccaL96	1589	VPusGfsggaAfgUfUfuaucAfgGfaucuusgsg	1590	CCAAGAUCCUGAUAAACUUCCCA	1591
AD-397239	asgsauc(Chd)UfgAfUfAfaacuucccaaL96	1592	VPusUfsgggAfaGfUfuuauCfaGfgaucususg	1593	CAAGAUCCUGAUAAACUUCCCAC	1594
AD-397240	csusuac(Chd)GfuUfGfCfcuaguugguaL96	1595	VPusAfsccaAfcUfAfggcaAfcGfguaagsgsa	1596	UCCUUACCGUUGCCUAGUUGGUG	1597
AD-397241	gsusgug(Uhd)CfcCfAfUfucuuuuacgaL96	1598	VPusCfsguaAfaAfGfaaugGfgAfcacacsusu	1599	AAGUGUGUCCCAUUCUUUUACGG	1600
AD-397242	gsusguc(Chd)CfaUfUfCfuuuuacggcaL96	1601	VPusGfsccgUfaAfAfagaaUfgGfgacacsasc	1602	GUGUGUCCCAUUCUUUUACGGCG	1603
AD-397243	csasuag(Chd)AfaCfCfGfugauugucaaL96	1604	VPusUfsgacAfaUfCfacggUfuGfcuaugsasc	1605	GUCAUAGCAACCGUGAUUGUCAU	1606
AD-397244	gsasacg(Ghd)AfuAfUfGfagaauccaaaL96	1607	VPusUfsuggAfuUfCfucauAfuCfcguucsusg	1608	CAGAACGGAUAUGAGAAUCCAAC	1609
AD-397245	usgsugu(Chd)CfcAfUfUfcuuuuacggaL96	1610	VPusCfscguAfaAfAfgaauGfgGfacacascsu	1611	AGUGUGUCCCAUUCUUUUACGGC	1612
AD-397246	gscsaac(Chd)GfuGfAfUfugucaucacaL96	1613	VPusGfsugaUfgAfCfaaucAfcGfguugcsusa	1614	UAGCAACCGUGAUUGUCAUCACC	1615
AD-397247	gscsagc(Ghd)AfgAfAfGfagcacuaacaL96	1616	VPusGfsuuaGfuGfCfucuuCfuCfgcugcsasu	1617	AUGCAGCGAGAAGAGCACUAACU	1618
AD-397248	csasgaa(Uhd)UfcGfGfAfcaugauucaaL96	1619	VPusUfsgaaUfcAfUfguccGfaAfuucugscsa	1620	UGCAGAAUUCGGACAUGAUUCAG	1621
AD-397249	uscscug(Ahd)UfaAfAfCfuucccacgaaL96	1622	VPusUfscguGfgGfAfaguuUfaUfcaggasusc	1623	GAUCCUGAUAAACUUCCCACGAC	1624
AD-397250	asgsaac(Ghd)GfaUfAfUfgagaauccaaL96	1625	VPusUfsggaUfuCfUfcauaUfcCfguucusgsc	1626	GCAGAACGGAUAUGAGAAUCCAA	1627
AD-397251	cscsuua(Chd)CfgUfUfGfccuaguuggaL96	1628	VPusCfscaaCfuAfGfgcaaCfgGfuaaggsasa	1629	UUCCUUACCGUUGCCUAGUUGGU	1630
AD-397252	asusccu(Ghd)AfuAfAfAfcuucccacgaL96	1631	VPusCfsgugGfgAfAfguuuAfuCfaggauscsu	1632	AGAUCCUGAUAAACUUCCCACGA	1633

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397253	cscsuga(Uhd)AfaAfCfUfucccacgacaL96	1634	VPusGfsucgUfgGfGfaaguUfuAfucaggsasu	1635	AUCCUGAUAAACUUCCCACGACA	1636
AD-397254	csgsgau(Ghd)GfaUfGfUfuugugagacaL96	1637	VPusGfsucuCfaCfAfaacaUfcCfauccgscsu	1638	AGCGGAUGGAUGUUUGUGAGACC	1639
AD-397255	gsascac(Ghd)GfaAfGfAfguacugcauaL96	1640	VPusAfsugcAfgUfAfcucuUfcCfgugucsasa	1641	UUGACACGGAAGAGUACUGCAUG	1642
AD-397256	gscsagc(Ahd)GfaAfCfGfgauaugagaaL96	1643	VPusUfscucAfuAfUfccguUfcUfgcugcsasu	1644	AUGCAGCAGAACGGAUAUGAGAA	1645
AD-397257	gscsaga(Ahd)CfgGfAfUfaugagaaucaL96	1646	VPusGfsauuCfuCfAfuaucCfgUfucugcsusg	1647	CAGCAGAACGGAUAUGAGAAUCC	1648
AD-397258	csasgaa(Chd)GfgAfUfAfugagaauccaL96	1649	VPusGfsgauUfcUfCfauauCfcGfuucugscsu	1650	AGCAGAACGGAUAUGAGAAUCCA	1651
AD-397259	ascscgu(Chd)GfcCfAfAfagagacaugaL96	1652	VPusCfsaugUfcUfCfuuugGfcGfacggusgsu	1653	ACACCGUCGCCAAAGAGACAUGC	1654
AD-397260	gsusucu(Ghd)UfgGfUfAfaacucaacaaL96	1655	VPusUfsguuGfaGfUfuuacCfaCfagaacsasu	1656	AUGUUCUGUGGUAAACUCAACAU	1657
AD-397261	gsgsuac(Uhd)UfuGfAfUfgucacugaaaL96	1658	VPusUfsucaGfuGfAfcaucAfaAfguaccsasg	1659	CUGGUACUUUGAUGUCACUGAAG	1660
AD-397262	cscscaa(Ahd)GfuUfUfAfcucaagacuaL96	1661	VPusAfsgucUfuGfAfguaaAfcUfuugggsusu	1662	AACCCAAAGUUUACUCAAGACUA	1663
AD-397263	cscsaaa(Ghd)UfuUfAfCfucaagacuaaL96	1664	VPusUfsaguCfuUfGfaguaAfaCfuuuggsgsu	1665	ACCCAAAGUUUACUCAAGACUAC	1666
AD-397264	csasuca(Uhd)GfuGfUfUfcaacaugcuaL96	1667	VPusAfsgcaUfgUfUfgaacAfcAfugaugsasg	1668	CUCAUCAUGUGUUCAACAUGCUG	1669
AD-397265	asascau(Ghd)CfuGfAfAfgaaguacguaL96	1670	VPusAfscguAfcUfUfcuucAfgCfauguusgsa	1671	UCAACAUGCUGAAGAAGUACGUC	1672
AD-397266	ususcug(Uhd)GfgUfAfAfacucaacauaL96	1673	VPusAfsuguUfgAfGfuuuaCfcAfcagaascsa	1674	UGUUCUGUGGUAAACUCAACAUG	1675
AD-397267	uscsugu(Ghd)GfuAfAfAfcucaacaugaL96	1676	VPusCfsaugUfuGfAfguuuAfcCfacagasasc	1677	GUUCUGUGGUAAACUCAACAUGC	1678

Таблица 5B. Модифицированные последовательности APP мыши, без линкера «L96», без винил-фосфата

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397175	csasugu(Uhd)CfuGfUfGfguaaacucaa	1403	usUfsgagUfuUfAfccacAfgAfacaugsgsc	1404	GCCAUGUUCUGUGGUAAACUCAA	1405
AD-397176	usgsuuc(Uhd)GfuGfGfUfaaacucaaca	1406	usGfsuugAfgUfUfuaccAfcAfgaacasusg	1407	CAUGUUCUGUGGUAAACUCAACA	1408
AD-397177	asusguu(Chd)UfgUfGfGfuaaacucaaa	1409	usUfsugaGfuUfUfaccaCfaGfaacausgsg	1410	CCAUGUUCUGUGGUAAACUCAAC	1411
AD-397178	csusgug(Ghd)UfaAfAfCfucaacaugca	1412	usGfscauGfuUfGfaguuUfaCfcacagsasa	1413	UUCUGUGGUAAACUCAACAUGCA	1414
AD-397179	gsgsuaa(Ahd)CfuCfAfAfcaugcacaua	1415	usAfsuguGfcAfUfguugAfgUfuuaccsasc	1416	GUGGUAAACUCAACAUGCACAUG	1417

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397180	usgsugg(Uhd)AfaAfCfUfcaacaugcaa	1418	usUfsgcaUfgUfUfgaguUfuAfccacasgsa	1419	UCUGUGGUAAACUCAACAUGCAC	1420
AD-397181	gsasaga(Ghd)CfaCfUfAfacuugcacga	1421	usCfsgugCfaAfGfuuagUfgCfucuucsusc	1422	GAGAAGAGCACUAACUUGCACGA	1423
AD-397182	cscsgcu(Ghd)GfuAfCfUfuugaugucaa	1424	usUfsgacAfuCfAfaaguAfcCfagcggsgsa	1425	UCCCGCUGGUACUUUGAUGUCAC	1426
AD-397183	cscsaug(Uhd)UfcUfGfUfgguaaacuca	1427	usGfsaguUfuAfCfcacaGfaAfcauggscsg	1428	CGCCAUGUUCUGUGGUAAACUCA	1429
AD-397184	gsusggu(Ahd)AfaCfUfCfaacaugcaca	1430	usGfsugcAfuGfUfugagUfuUfaccacsasg	1431	CUGUGGUAAACUCAACAUGCACA	1432
AD-397185	gsasacu(Ghd)CfaGfAfUfcacaaacgua	1433	usAfscguUfuGfUfgaucUfgCfaguucsasg	1434	CUGAACUGCAGAUCACAAACGUG	1435
AD-397186	asasgag(Chd)AfcUfAfAfcuugcacgaa	1436	usUfscguGfcAfAfguuaGfuGfcucuuscsu	1437	AGAAGAGCACUAACUUGCACGAC	1438
AD-397187	asgscac(Uhd)AfaCfUfUfgcacgacuaa	1439	usUfsaguCfgUfGfcaagUfuAfgugcuscsu	1440	AGAGCACUAACUUGCACGACUAU	1441
AD-397188	gscsacu(Ahd)AfcUfUfGfcacgacuaua	1442	usAfsuagUfcGfUfgcaaGfuUfagugcsusc	1443	GAGCACUAACUUGCACGACUAUG	1444
AD-397189	asasagu(Uhd)UfaCfUfCfaagacuacca	1445	usGfsguaGfuCfUfugagUfaAfacuuusgsg	1446	CCAAAGUUUACUCAAGACUACCA	1447
AD-397190	csgscau(Ghd)AfaCfCfAfgucucuguca	1448	usGfsacaGfaGfAfcuggUfuCfaugcgscsu	1449	AGCGCAUGAACCAGUCUCUGUCC	1450
AD-397191	csascau(Chd)GfuGfAfUfuccuuaccga	1451	usCfsgguAfaGfGfaaucAfcGfaugugsgsg	1452	CCCACAUCGUGAUUCCUUACCGU	1453
AD-397192	asusgcu(Ghd)AfaGfAfAfguacguccga	1454	usCfsggaCfgUfAfcuucUfuCfagcausgsu	1455	ACAUGCUGAAGAAGUACGUCCGU	1456
AD-397193	gsasgcg(Chd)AfuGfAfAfccagucucua	1457	usAfsgagAfcUfGfguucAfuGfcgcucsgsu	1458	ACGAGCGCAUGAACCAGUCUCUG	1459
AD-397194	gsasgca(Ghd)AfaCfUfAfcuccgacgaa	1460	usUfscguCfgGfAfguagUfuCfugcucscsu	1461	AGGAGCAGAACUACUCCGACGAU	1462
AD-397195	csasccc(Ahd)CfaUfCfGfugauuccuua	1463	usAfsaggAfaUfCfacgaUfgUfgggugsusg	1464	CACACCCACAUCGUGAUUCCUUA	1465
AD-397196	asgsagc(Ahd)CfuAfAfCfuugcacgaca	1466	usGfsucgUfgCfAfaguuAfgUfgcucususc	1467	GAAGAGCACUAACUUGCACGACU	1468
AD-397197	csascua(Ahd)CfuUfGfCfacgacuauga	1469	usCfsauaGfuCfGfugcaAfgUfuagugscsu	1470	AGCACUAACUUGCACGACUAUGG	1471
AD-397198	csuscaa(Ghd)AfcUfAfCfcagugaacca	1472	usGfsguuCfaCfUfgguaGfuCfuugagsusa	1473	UACUCAAGACUACCAGUGAACCU	1474
AD-397199	asgscac(Ahd)CfcCfUfAfaagcauuuua	1475	usAfsaaaUfgCfUfuuagGfgUfgugcusgsu	1476	ACAGCACACCCUAAAGCAUUUUG	1477
AD-397200	asasgga(Ghd)CfaGfAfAfcuacuccgaa	1478	usUfscggAfgUfAfguucUfgCfuccuuscsu	1479	AGAAGGAGCAGAACUACUCCGAC	1480
AD-397201	gsgsagc(Ahd)GfaAfCfUfacuccgacga	1481	usCfsgucGfgAfGfuaguUfcUfgcuccsusu	1482	AAGGAGCAGAACUACUCCGACGA	1483
AD-397202	gsasaac(Ahd)GfuAfCfAfcauccaucca	1484	usGfsgauGfgAfUfguguAfcUfguuucsusu	1485	AAGAAACAGUACACAUCCAUCCA	1486
AD-397203	csusgaa(Chd)UfgCfAfGfaucacaaaca	1487	usGfsuuuGfuGfAfucugCfaGfuucagsgsg	1488	CCCUGAACUGCAGAUCACAAACG	1489
AD-397204	cscsaca(Uhd)CfgUfGfAfuuccuuacca	1490	usGfsguaAfgGfAfaucaCfgAfuguggsgsu	1491	ACCCACAUCGUGAUUCCUUACCG	1492
AD-397205	gsusgcc(Chd)GfaCfAfAfgugcaaguua	1493	usAfsacuUfgCfAfcuugUfcGfggcacsgsa	1494	UCGUGCCCGACAAGUGCAAGUUC	1495

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397206	gsascua(Chd)CfaGfUfGfaaccucuuca	1496	usGfsaagAfgGfUfucacUfgGfuagucsusu	1497	AAGACUACCAGUGAACCUCUUCC	1498
AD-397207	gsusccg(Chd)CfaUfCfAfaaaacuggua	1499	usAfsccaGfuUfUfuugaUfgGfcggacsusu	1500	AAGUCCGCCAUCAAAAACUGGUG	1501
AD-397208	gsgscccc(Uhd)CfgAfGfAfauuacaucaa	1502	usUfsgauGfuAfAfuucuCfgAfgggccsasg	1503	CUGGCCCUCGAGAAUUACAUCAC	1504
AD-397209	csasugc(Uhd)GfaAfGfAfaguacgucca	1505	usGfsgacGfuAfCfuucuUfcAfgcaugsusu	1506	AACAUGCUGAAGAAGUACGUCCG	1507
AD-397210	usgscug(Ahd)AfgAfAfGfuacgucccgua	1508	usAfscggAfcGfUfacuuCfuUfcagcasusg	1509	CAUGCUGAAGAAGUACGUCCGUG	1510
AD-397211	uscscgc(Chd)AfuCfAfAfaaacugguga	1511	usCfsaccAfgUfUfuuugAfuGfgcggascsu	1512	AGUCCGCCAUCAAAAACUGGUGU	1513
AD-397212	ususgca(Chd)GfaCfUfAfuggcaugcua	1514	usAfsgcaUfgCfCfauagUfcGfugcaasgsu	1515	ACUUGCACGACUAUGGCAUGCUG	1516
AD-397213	uscscca(Ghd)GfuCfAfUfgagagaauga	1517	usCfsauuCfuCfUfcaugAfcCfugggascsa	1518	UGUCCCAGGUCAUGAGAGAAUGG	1519
AD-397214	csusgaa(Ghd)AfaGfUfAfcguccgugca	1520	usGfscacGfgAfCfguacUfuCfuucagscsa	1521	UGCUGAAGAAGUACGUCCGUGCG	1522
AD-397215	csgsugu(Ghd)AfuCfUfAfcgagcgcaua	1523	usAfsugcGfcUfCfguagAfuCfacacgsgsa	1524	UCCGUGUGAUCUACGAGCGCAUG	1525
AD-397216	usascug(Chd)CfaAfGfAfggucuaccca	1526	usGfsgguAfgAfCfcucuUfgGfcaguascsu	1527	AGUACUGCCAAGAGGUCUACCCU	1528
AD-397217	csasccg(Ahd)GfaGfAfGfaaugucccaa	1529	usUfsgggAfcAfUfucucUfcUfcggugscsu	1530	AGCACCGAGAGAGAAUGUCCCAG	1531
AD-397218	csasagg(Chd)CfuCfAfUfcauguguuca	1532	usGfsaacAfcAfUfgaugAfgGfccuugsgsg	1533	CCCAAGGCCUCAUCAUGUGUUCA	1534
AD-397219	gscsuga(Ahd)GfaAfGfUfacgucccguga	1535	usCfsacgGfaCfGfuacuUfcUfucagcsasu	1536	AUGCUGAAGAAGUACGUCCGUGC	1537
AD-397220	asasgca(Uhd)UfuUfGfAfacaugugcga	1538	usCfsgcaCfaUfGfuucaAfaAfugcuususa	1539	UAAAGCAUUUUGAACAUGUGCGC	1540
AD-397221	csascca(Chd)CfgUfGfUfgaucuacgaa	1541	usUfscguAfgAfUfcacaCfgGfaggugsusg	1542	CACACCUCCGUGUGAUCUACGAG	1543
AD-397222	gsasagg(Ahd)GfcAfGfAfacuacuccga	1544	usCfsggaGfuAfGfuucuGfcUfccuucsusg	1545	CAGAAGGAGCAGAACUACUCCGA	1546
AD-397223	gsasaga(Ahd)AfcAfGfUfacacauccaa	1547	usUfsggaUfgUfGfuacuGfuUfucuucsusu	1548	AAGAAGAAACAGUACACAUCCAU	1549
AD-397224	gsusacu(Ghd)CfcAfAfGfaggucuacca	1550	usGfsguaGfaCfCfucuuGfgCfaguacsusg	1551	CAGUACUGCCAAGAGGUCUACCC	1552
AD-397225	ascsugc(Chd)AfaGfAfGfgucuacccua	1553	usAfsgggUfaGfAfccucUfuGfgcagusasc	1554	GUACUGCCAAGAGGUCUACCCUG	1555
AD-397226	ascsuaa(Chd)UfuGfCfAfcgacuaugga	1556	usCfscauAfgUfCfgugcAfaGfuuagusgsc	1557	GCACUAACUUGCACGACUAUGGC	1558
AD-397227	gsusccc(Ahd)UfuCfUfUfuuacggcgga	1559	usCfscgcCfgUfAfaaagAfaUfgggacsasc	1560	GUGUCCCAUUCUUUUACGGCGGA	1561
AD-397228	asasgcu(Ghd)AfcAfAfGfaaggccguua	1562	usAfsacgGfcCfUfucuuGfuCfagcuususg	1563	CAAAGCUGACAAGAAGGCCGUUA	1564
AD-397229	usgsaca(Ahd)GfaAfGfGfccguuaucca	1565	usGfsgauAfaCfGfgccuUfcUfugucasgsc	1566	GCUGACAAGAAGGCCGUUAUCCA	1567
AD-397230	asgscau(Uhd)UfuGfAfAfcaugugcgca	1568	usGfscgcAfcAfUfguucAfaAfaugcususu	1569	AAAGCAUUUUGAACAUGUGCGCA	1570
AD-397231	usgsuga(Uhd)CfuAfCfGfagcgcaugaa	1571	usUfscauGfcGfCfucguAfgAfucacascsg	1572	CGUGUGAUCUACGAGCGCAUGAA	1573

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397233	csasgcg(Ahd)GfaAfGfAfgcacuaacua	1574	usAfsguuAfgUfGfcucuUfcUfcgcugscsa	1575	UGCAGCGAGAAGAGCACUAACUU	1576
AD-397234	asgscgu(Ghd)UfcAfAfCfccaaaguuua	1577	usAfsaacUfuUfGfgguuGfaCfacgcusgsc	1578	GCAGCGUGUCAACCCAAAGUUUA	1579
AD-397235	usgsuca(Ahd)CfcCfAfAfaguuuacuca	1580	usGfsaguAfaAfCfuuugGfgUfugacascsg	1581	CGUGUCAACCCAAAGUUUACUCA	1582
AD-397236	usgsucc(Chd)AfuUfCfUfuuuacggcga	1583	usCfsgccGfuAfAfaagaAfuGfggacascsa	1584	UGUGUCCCAUUCUUUUACGGCGG	1585
AD-397237	gsusguc(Ahd)AfcCfCfAfaaguuuacua	1586	usAfsguaAfaCfUfuuggGfuUfgacacsgsc	1587	GCGUGUCAACCCAAAGUUUACUC	1588
AD-397238	asasgau(Chd)CfuGfAfUfaaacuuccca	1589	usGfsggaAfgUfUfuaucAfgGfaucuusgsg	1590	CCAAGAUCCUGAUAAACUUCCCA	1591
AD-397239	asgsauc(Chd)UfgAfUfAfaacuucccaa	1592	usUfsgggAfaGfUfuuauCfaGfgaucususg	1593	CAAGAUCCUGAUAAACUUCCCAC	1594
AD-397240	csusuac(Chd)GfuUfGfCfcuaguuggua	1595	usAfsccaAfcUfAfggcaAfcGfguaagsgsa	1596	UCCUUACCGUUGCCUAGUUGGUG	1597
AD-397241	gsusgug(Uhd)CfcCfAfUfucuuuuacga	1598	usCfsguaAfaAfGfaaugGfgAfcacacsusu	1599	AAGUGUGUCCCAUUCUUUUACGG	1600
AD-397242	gsusguc(Chd)CfaUfUfCfuuuuacggca	1601	usGfsccgUfaAfAfagaaUfgGfgacacsasc	1602	GUGUGUCCCAUUCUUUUACGGCG	1603
AD-397243	csasuag(Chd)AfaCfCfGfugauugucaa	1604	usUfsgacAfaUfCfacggUfuGfcuaugsasc	1605	GUCAUAGCAACCGUGAUUGUCAU	1606
AD-397244	gsasacg(Ghd)AfuAfUfGfagaauccaaa	1607	usUfsuggAfuUfCfucauAfuCfcguucsusg	1608	CAGAACGGAUAUGAGAAUCCAAC	1609
AD-397245	usgsugu(Chd)CfcAfUfUfcuuuuacgga	1610	usCfscguAfaAfAfgaauGfgGfacacascsu	1611	AGUGUGUCCCAUUCUUUUACGGC	1612
AD-397246	gscsaac(Chd)GfuGfAfUfugucaucaca	1613	usGfsugaUfgAfCfaaucAfcGfguugcsusa	1614	UAGCAACCGUGAUUGUCAUCACC	1615
AD-397247	gscsagc(Ghd)AfgAfAfGfagcacuaaca	1616	usGfsuuaGfuGfCfucuuCfuCfgcugcsasu	1617	AUGCAGCGAGAAGAGCACUAACU	1618
AD-397248	csasgaa(Uhd)UfcGfGfAfcaugauucaa	1619	usUfsgaaUfcAfUfguccGfaAfuucugscsa	1620	UGCAGAAUUCGGACAUGAUUCAG	1621
AD-397249	uscscug(Ahd)UfaAfAfCfuucccacgaa	1622	usUfscguGfgGfAfaguuUfaUfcaggasusc	1623	GAUCCUGAUAAACUUCCCACGAC	1624
AD-397250	asgsaac(Ghd)GfaUfAfUfgagaauccaa	1625	usUfsggaUfuCfUfcauaUfcCfguucusgsc	1626	GCAGAACGGAUAUGAGAAUCCAA	1627
AD-397251	cscsuua(Chd)CfgUfUfGfccuaguugga	1628	usCfscaaCfuAfGfgcaaCfgGfuaaggsasa	1629	UUCCUUACCGUUGCCUAGUUGGU	1630
AD-397252	asusccu(Ghd)AfuAfAfAfcuucccacga	1631	usCfsgugGfgAfAfguuuAfuCfaggauscsu	1632	AGAUCCUGAUAAACUUCCCACGA	1633
AD-397253	cscsuga(Uhd)AfaAfCfUfucccacgaca	1634	usGfsucgUfgGfGfaaguUfuAfucaggsasu	1635	AUCCUGAUAAACUUCCCACGACA	1636
AD-397254	csgsgau(Ghd)GfaUfGfUfuugugagaca	1637	usGfsucuCfaCfAfaacaUfcCfauccgscsu	1638	AGCGGAUGGAUGUUUGUGAGACC	1639
AD-397255	gsascac(Ghd)GfaAfGfAfguacugcaua	1640	usAfsugcAfgUfAfcucuUfcCfgugucsasa	1641	UUGACACGGAAGAGUACUGCAUG	1642
AD-397256	gscsagc(Ahd)GfaAfCfGfgauaugagaa	1643	usUfscucAfuAfUfccguUfcUfgcugcsasu	1644	AUGCAGCAGAACGGAUAUGAGAA	1645
AD-397257	gscsaga(Ahd)CfgGfAfUfaugagaauca	1646	usGfsauuCfuCfAfuaucCfgUfucugcsusg	1647	CAGCAGAACGGAUAUGAGAAUCC	1648
AD-397258	csasgaa(Chd)GfgAfUfAfugagaaucca	1649	usGfsgauUfcUfCfauauCfcGfuucugscsu	1650	AGCAGAACGGAUAUGAGAAUCCA	1651

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-397259	ascscgu(Chd)GfcCfAfAfagagacauga	1652	usCfsaugUfcUfCfuuugGfcGfacggusgsu	1653	ACACCGUCGCCAAAGAGACAUGC	1654
AD-397260	gsusucu(Ghd)UfgGfUfAfaacucaacaa	1655	usUfsguuGfaGfUfuuacCfaCfagaacsasu	1656	AUGUUCUGUGGUAAACUCAACAU	1657
AD-397261	gsgsuac(Uhd)UfuGfAfUfgucacugaaa	1658	usUfsucaGfuGfAfcaucAfaAfguaccsasg	1659	CUGGUACUUUGAUGUCACUGAAG	1660
AD-397262	cscscaa(Ahd)GfuUfUfAfcucaagacua	1661	usAfsgucUfuGfAfguaaAfcUfuugggsusu	1662	AACCCAAAGUUUACUCAAGACUA	1663
AD-397263	cscsaaa(Ghd)UfuUfAfCfucaagacuaa	1664	usUfsaguCfuUfGfaguaAfaCfuuuggsgsu	1665	ACCCAAAGUUUACUCAAGACUAC	1666
AD-397264	csasuca(Uhd)GfuGfUfUfcaacaugcua	1667	usAfsgcaUfgUfUfgaacAfcAfugaugsasg	1668	CUCAUCAUGUGUUCAACAUGCUG	1669
AD-397265	asascau(Ghd)CfuGfAfAfgaaguacgua	1670	usAfscguAfcUfUfcuucAfgCfauguusgsa	1671	UCAACAUGCUGAAGAAGUACGUC	1672
AD-397266	ususcug(Uhd)GfgUfAfAfacucaacaua	1673	usAfsuguUfgAfGfuuuaCfcAfcagaascsa	1674	UGUUCUGUGGUAAACUCAACAUG	1675
AD-397267	uscsugu(Ghd)GfuAfAfAfcucaacauga	1676	usCfsaugUfuGfAfguuuAfcCfacagasasc	1677	GUUCUGUGGUAAACUCAACAUGC	1678

Таблица 6. Немодифицированные последовательности APP, нацеливание на NM_001198823.1 мыши

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Положение в NM_001198823.1	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Положение в NM_001198823.1
AD-397183	CCAUGUUCUGUGGUAAACUCA	1679	253-273	UGAGUUUACCACAGAACAUGGCG	1680	251-273
AD-397175	CAUGUUCUGUGGUAAACUCAA	1681	254-274	UUGAGUUUACCACAGAACAUGGC	1682	252-274
AD-397177	AUGUUCUGUGGUAAACUCAAA	1683	255-275	UUUGAGUUUACCACAGAACAUGG	1684	253-275
AD-397176	UGUUCUGUGGUAAACUCAACA	1685	256-276	UGUUGAGUUUACCACAGAACAUG	1686	254-276
AD-397260	GUUCUGUGGUAAACUCAACAA	1687	257-277	UUGUUGAGUUUACCACAGAACAU	1688	255-277
AD-397266	UUCUGUGGUAAACUCAACAUA	1689	258-278	UAUGUUGAGUUUACCACAGAACA	1690	256-278
AD-397267	UCUGUGGUAAACUCAACAUGA	1691	259-279	UCAUGUUGAGUUUACCACAGAAC	1692	257-279
AD-397178	CUGUGGUAAACUCAACAUGCA	1693	260-280	UGCAUGUUGAGUUUACCACAGAA	1694	258-280
AD-397180	UGUGGUAAACUCAACAUGCAA	1695	261-281	UUGCAUGUUGAGUUUACCACAGA	1696	259-281
AD-397184	GUGGUAAACUCAACAUGCACA	1697	262-282	UGUGCAUGUUGAGUUUACCACAG	1698	260-282
AD-397179	GGUAAACUCAACAUGCACAUA	1699	264-284	UAUGUGCAUGUUGAGUUUACCAC	1700	262-284
AD-397224	GUACUGCCAAGAGGUCUACCA	1701	362-382	UGGUAGACCUCUUGGCAGUACUG	1702	360-382
AD-397216	UACUGCCAAGAGGUCUACCCA	1703	363-383	UGGGUAGACCUCUUGGCAGUACU	1704	361-383

AD-397225	ACUGCCAAGAGGUCUACCCUA	1705	364-384	UAGGGUAGACCUCUUGGCAGUAC	1706	362-384
AD-397203	CUGAACUGCAGAUCACAAACA	1707	382-402	UGUUUGUGAUCUGCAGUUCAGGG	1708	380-402
AD-397185	GAACUGCAGAUCACAAACGUA	1709	384-404	UACGUUUGUGAUCUGCAGUUCAG	1710	382-404
AD-397195	CACCCACAUCGUGAUUCCUUA	1711	473-493	UAAGGAAUCACGAUGUGGGUGUG	1712	471-493
AD-397204	CCACAUCGUGAUUCCUUACCA	1713	476-496	UGGUAAGGAAUCACGAUGUGGGU	1714	474-496
AD-397191	CACAUCGUGAUUCCUUACCGA	1715	477-497	UCGGUAAGGAAUCACGAUGUGGG	1716	475-497
AD-397251	CCUUACCGUUGCCUAGUUGGA	1717	489-509	UCCAACUAGGCAACGGUAAGGAA	1718	487-509
AD-397240	CUUACCGUUGCCUAGUUGGUA	1719	490-510	UACCAACUAGGCAACGGUAAGGA	1720	488-510
AD-397205	GUGCCCGACAAGUGCAAGUUA	1721	534-554	UAACUUGCACUUGUCGGGCACGA	1722	532-554
AD-397254	CGGAUGGAUGUUUGUGAGACA	1723	567-587	UGUCUCACAAACAUCCAUCCGCU	1724	565-587
AD-397259	ACCGUCGCCAAAGAGACAUGA	1725	603-623	UCAUGUCUCUUUGGCGACGGUGU	1726	601-623
AD-397247	GCAGCGAGAAGAGCACUAACA	1727	622-642	UGUUAGUGCUCUUCUCGCUGCAU	1728	620-642
AD-397233	CAGCGAGAAGAGCACUAACUA	1729	623-643	UAGUUAGUGCUCUUCUCGCUGCA	1730	621-643
AD-397181	GAAGAGCACUAACUUGCACGA	1731	629-649	UCGUGCAAGUUAGUGCUCUUCUC	1732	627-649
AD-397186	AAGAGCACUAACUUGCACGAA	1733	630-650	UUCGUGCAAGUUAGUGCUCUUCU	1734	628-650
AD-397196	AGAGCACUAACUUGCACGACA	1735	631-651	UGUCGUGCAAGUUAGUGCUCUUC	1736	629-651
AD-397187	AGCACUAACUUGCACGACUAA	1737	633-653	UUAGUCGUGCAAGUUAGUGCUCU	1738	631-653
AD-397188	GCACUAACUUGCACGACUAUA	1739	634-654	UAUAGUCGUGCAAGUUAGUGCUC	1740	632-654
AD-397197	CACUAACUUGCACGACUAUGA	1741	635-655	UCAUAGUCGUGCAAGUUAGUGCU	1742	633-655
AD-397226	ACUAACUUGCACGACUAUGGA	1743	636-656	UCCAUAGUCGUGCAAGUUAGUGC	1744	634-656
AD-397212	UUGCACGACUAUGGCAUGCUA	1745	642-662	UAGCAUGCCAUAGUCGUGCAAGU	1746	640-662
AD-397182	CCGCUGGUACUUUGAUGUCAA	1747	1064-1084	UUGACAUCAAAGUACCAGCGGGA	1748	1062-1084
AD-397261	GGUACUUUGAUGUCACUGAAA	1749	1069-1089	UUUCAGUGACAUCAAAGUACCAG	1750	1067-1089
AD-397241	GUGUGUCCCAUUCUUUUACGA	1751	1094-1114	UCGUAAAAGAAUGGGACACACUU	1752	1092-1114
AD-397245	UGUGUCCCAUUCUUUUACGGA	1753	1095-1115	UCCGUAAAAGAAUGGGACACACU	1754	1093-1115
AD-397242	GUGUCCCAUUCUUUUACGGCA	1755	1096-1116	UGCCGUAAAAGAAUGGGACACAC	1756	1094-1116
AD-397236	UGUCCCAUUCUUUUACGGCGA	1757	1097-1117	UCGCCGUAAAAGAAUGGGACACA	1758	1095-1117
AD-397227	GUCCCAUUCUUUUACGGCGGA	1759	1098-1118	UCCGCCGUAAAAGAAUGGGACAC	1760	1096-1118
AD-397255	GACACGGAAGAGUACUGCAUA	1761	1143-1163	UAUGCAGUACUCUUCCGUGUCAA	1762	1141-1163
AD-397234	AGCGUGUCAACCCAAAGUUUA	1763	1176-1196	UAAACUUUGGGUUGACACGCUGC	1764	1174-1196
AD-397237	GUGUCAACCCAAAGUUUACUA	1765	1179-1199	UAGUAAACUUUGGGUUGACACGC	1766	1177-1199
AD-397235	UGUCAACCCAAAGUUUACUCA	1767	1180-1200	UGAGUAAACUUUGGGUUGACACG	1768	1178-1200
AD-397262	CCCAAAGUUUACUCAAGACUA	1769	1186-1206	UAGUCUUGAGUAAACUUUGGGUU	1770	1184-1206
AD-397263	CCAAAGUUUACUCAAGACUAA	1771	1187-1207	UUAGUCUUGAGUAAACUUUGGGU	1772	1185-1207

AD-397189	AAAGUUUACUCAAGACUACCA	1773	1189-1209	UGGUAGUCUUGAGUAAACUUUGG	1774	1187-1209
AD-397198	CUCAAGACUACCAGUGAACCA	1775	1197-1217	UGGUUCACUGGUAGUCUUGAGUA	1776	1195-1217
AD-397206	GACUACCAGUGAACCUCUUCA	1777	1202-1222	UGAAGAGGUUCACUGGUAGUCUU	1778	1200-1222
AD-397238	AAGAUCCUGAUAAACUUCCCA	1779	1225-1245	UGGGAAGUUUAUCAGGAUCUUGG	1780	1223-1245
AD-397239	AGAUCCUGAUAAACUUCCCAA	1781	1226-1246	UUGGGAAGUUUAUCAGGAUCUUG	1782	1224-1246
AD-397252	AUCCUGAUAAACUUCCCACGA	1783	1228-1248	UCGUGGGAAGUUUAUCAGGAUCU	1784	1226-1248
AD-397249	UCCUGAUAAACUUCCCACGAA	1785	1229-1249	UUCGUGGGAAGUUUAUCAGGAUC	1786	1227-1249
AD-397253	CCUGAUAAACUUCCCACGACA	1787	1230-1250	UGUCGUGGGAAGUUUAUCAGGAU	1788	1228-1250
AD-397217	CACCGAGAGAGAAUGUCCCAA	1789	1353-1373	UUGGGACAUUCUCUCUCGGUGCU	1790	1351-1373
AD-397213	UCCCAGGUCAUGAGAGAAUGA	1791	1368-1388	UCAUUCUCUCAUGACCUGGGACA	1792	1366-1388
AD-397228	AAGCUGACAAGAAGGCCGUUA	1793	1423-1443	UAACGGCCUUCUUGUCAGCUUUG	1794	1421-1443
AD-397229	UGACAAGAAGGCCGUUAUCCA	1795	1427-1447	UGGAUAACGGCCUUCUUGUCAGC	1796	1425-1447
AD-397208	GGCCCUCGAGAAUUACAUCAA	1797	1562-1582	UUGAUGUAAUUCUCGAGGGCCAG	1798	1560-1582
AD-397218	CAAGGCCUCAUCAUGUGUUCA	1799	1603-1623	UGAACACAUGAUGAGGCCUUGGG	1800	1601-1623
AD-397264	CAUCAUGUGUUCAACAUGCUA	1801	1611-1631	UAGCAUGUUGAACACAUGAUGAG	1802	1609-1631
AD-397265	AACAUGCUGAAGAAGUACGUA	1803	1623-1643	UACGUACUUCUUCAGCAUGUUGA	1804	1621-1643
AD-397209	CAUGCUGAAGAAGUACGUCCA	1805	1625-1645	UGGACGUACUUCUUCAGCAUGUU	1806	1623-1645
AD-397192	AUGCUGAAGAAGUACGUCCGA	1807	1626-1646	UCGGACGUACUUCUUCAGCAUGU	1808	1624-1646
AD-397210	UGCUGAAGAAGUACGUCCGUA	1809	1627-1647	UACGGACGUACUUCUUCAGCAUG	1810	1625-1647
AD-397219	GCUGAAGAAGUACGUCCGUGA	1811	1628-1648	UCACGGACGUACUUCUUCAGCAU	1812	1626-1648
AD-397214	CUGAAGAAGUACGUCCGUGCA	1813	1629-1649	UGCACGGACGUACUUCUUCAGCA	1814	1627-1649
AD-397199	AGCACACCCUAAAGCAUUUUA	1815	1666-1686	UAAAAUGCUUUAGGGUGUGCUGU	1816	1664-1686
AD-397220	AAGCAUUUUGAACAUGUGCGA	1817	1677-1697	UCGCACAUGUUCAAAAUGCUUUA	1818	1675-1697
AD-397230	AGCAUUUUGAACAUGUGCGCA	1819	1678-1698	UGCGCACAUGUUCAAAAUGCUUU	1820	1676-1698
AD-397221	CACCUCCGUGUGAUCUACGAA	1821	1746-1766	UUCGUAGAUCACACGGAGGUGUG	1822	1744-1766
AD-397215	CGUGUGAUCUACGAGCGCAUA	1823	1752-1772	UAUGCGCUCGUAGAUCACACGGA	1824	1750-1772
AD-397231	UGUGAUCUACGAGCGCAUGAA	1825	1754-1774	UUCAUGCGCUCGUAGAUCACACG	1826	1752-1774
AD-397193	GAGCGCAUGAACCAGUCUCUA	1827	1764-1784	UAGAGACUGGUUCAUGCGCUCGU	1828	1762-1784
AD-397190	CGCAUGAACCAGUCUCUGUCA	1829	1767-1787	UGACAGAGACUGGUUCAUGCGCU	1830	1765-1787
AD-397222	GAAGGAGCAGAACUACUCCGA	1831	1850-1870	UCGGAGUAGUUCUGCUCCUUCUG	1832	1848-1870
AD-397200	AAGGAGCAGAACUACUCCGAA	1833	1851-1871	UUCGGAGUAGUUCUGCUCCUUCU	1834	1849-1871
AD-397201	GGAGCAGAACUACUCCGACGA	1835	1853-1873	UCGUCGGAGUAGUUCUGCUCCUU	1836	1851-1873
AD-397194	GAGCAGAACUACUCCGACGAA	1837	1854-1874	UUCGUCGGAGUAGUUCUGCUCCU	1838	1852-1874
AD-397248	CAGAAUUCGGACAUGAUUCAA	1839	2167-2187	UUGAAUCAUGUCCGAAUUCUGCA	1840	2165-2187

AD-397207	GUCCGCCAUCAAAAACUGGUA	1841	2196-2216	UACCAGUUUUUGAUGGCGGACUU	1842	2194-2216
AD-397211	UCCGCCAUCAAAAACUGGUGA	1843	2197-2217	UCACCAGUUUUUGAUGGCGGACU	1844	2195-2217
AD-397243	CAUAGCAACCGUGAUUGUCAA	1845	2282-2302	UUGACAAUCACGGUUGCUAUGAC	1846	2280-2302
AD-397246	GCAACCGUGAUUGUCAUCACA	1847	2286-2306	UGUGAUGACAAUCACGGUUGCUA	1848	2284-2306
AD-397223	GAAGAAACAGUACACAUCCAA	1849	2321-2341	UUGGAUGUGUACUGUUUCUUCUU	1850	2319-2341
AD-397202	GAAACAGUACACAUCCAUCCA	1851	2324-2344	UGGAUGGAUGUGUACUGUUUCUU	1852	2322-2344
AD-397256	GCAGCAGAACGGAUAUGAGAA	1853	2405-2425	UUCUCAUAUCCGUUCUGCUGCAU	1854	2403-2425
AD-397257	GCAGAACGGAUAUGAGAAUCA	1855	2408-2428	UGAUUCUCAUAUCCGUUCUGCUG	1856	2406-2428
AD-397258	CAGAACGGAUAUGAGAAUCCA	1857	2409-2429	UGGAUUCUCAUAUCCGUUCUGCU	1858	2407-2429
AD-397250	AGAACGGAUAUGAGAAUCCAA	1859	2410-2430	UUGGAUUCUCAUAUCCGUUCUGC	1860	2408-2430
AD-397244	GAACGGAUAUGAGAAUCCAAA	1861	2411-2431	UUUGGAUUCUCAUAUCCGUUCUG	1862	2409-2431

Таблица 7. Скрининг с использованием однократной дозы для APP на первичных гепатоцитах мыши и линии клеток Neuro2A

Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК относительно ненацеливающегося контроля AD-1955

	Первичные гепатоциты мыши				Линия клеток Neuro2A			
Название дуплекса	**10 нМ, среднее**	**10 нМ, SD**	**0,1 нМ, среднее**	**0,1 нМ, SD**	**10 нМ, среднее**	**10 нМ, SD**	**0,1 нМ, среднее**	**0,1 нМ, SD**
AD-397183	4,2	1,4	37,3	24,3	7,94	2,86	52,66	5,87
AD-397175	1,6	0,7	4,7	1,3	0,75	0,32	29,72	6,47
AD-397177	1,3	1,1	3,9	2,6	0,4	0,13	18,06	3,73
AD-397176	1,5	0,5	35,1	11,3	4,7	1,45	69,36	7,89
AD-397260	11,2	1,5	73,4	23,1	20,53	3,62	81,33	2,21
AD-397266	2,8	2	65,1	4,5	4,35	0,58	73,16	8,45
AD-397267	0,8	0,3	23,6	4,2	1,18	0,28	37,78	3,45
AD-397178	5,1	4,1	33,3	6,1	1,8	0,38	54,61	3,11
AD-397180	1,3	0,4	28	13,9	0,47	0,06	37,8	3,96
AD-397184	15,7	8,9	67,8	13,5	8,86	2,55	87,82	5,6
AD-397179	5,7	1,6	45,1	26	3,12	0,86	57,24	5,19
AD-397224	52,9	18,5	63,8	10,6	17,15	2,47	67,99	7,6
AD-397216	25,6	17,9	104,2	21,6	34,91	7,44	98,89	4,08
AD-397225	45,1	21,9	60,8	13,7	9,72	5,52	63,44	7,19
AD-397203	3,3	1,6	71,9	8,2	5,1	0,98	75,87	3,29
AD-397185	4,9	2,1	40,3	8,1	2,7	0,35	61,49	8,12
AD-397195	2,5	1,3	49,8	21,8	1,64	0,08	63,95	5,83
AD-397204	8,3	2	68	10,7	4,37	0,89	50,83	7,41
AD-397191	1,5	0,5	39,9	14,8	1,5	1,06	55,07	10,78
AD-397251	7,8	1,7	91,7	5,7	3,86	2,5	84,36	6,5
AD-397240	4,2	1,9	61,9	6,8	2,48	0,7	62,39	1,48
AD-397205	13,5	10,5	86	11,4	13,06	7,61	76,77	2,64
AD-397254	1,9	1,1	27,6	24,3	3,77	2,77	57,26	14,42
AD-397259	3,5	0,7	79	22,8	9,43	1,12	82,49	3,19
AD-397247	5,5	1	90,4	16,9	10,95	2,85	94,95	4,55
AD-397233	6,7	6,2	84,4	10,3	3,4	1,14	76,36	4,66
AD-397181	4,7	0,9	60,5	25,2	6,28	2,17	62,62	3,59
AD-397186	53	17	82	14,7	42,07	9,63	95,63	6,67
AD-397196	1,9	0,4	40,9	11,3	4,66	4,19	56,2	1,82
AD-397187	28,4	11,2	77,5	13,3	25,64	8,56	86,64	5,99
AD-397188	65,1	15,9	76,2	20	43,32	13,51	84,69	5,63
AD-397197	2	1	41,9	10,7	2,11	0,41	55,63	2,15
AD-397226	10,3	4,3	30	5	0,69	0,43	47,42	5,33
AD-397212	1,8	0,1	65,4	9,3	1,94	0,48	63	29,9
AD-397182	2,1	0,6	11,3	5,3	12,2	3,42	35,13	6,78
AD-397261	2,3	0,6	32,6	10	29,93	2,71	48,28	24,73
AD-397241	23	3,5	102,7	13,3	41,16	4,58	92,7	5,11
AD-397245	60,9	8,6	60,9	14,3	55,71	4,45	68,27	6,83

AD-397242	5,6	1,1	90,5	16,2	30,83	2,94	85,43	4,05
AD-397236	16,9	6,2	71,9	5,7	32,58	2,93	67,13	3,06
AD-397227	48,7	29,8	50,5	19,4	19,55	9,28	59,59	3,24
AD-397255	6,1	0,8	73,8	33	24,01	5	86,3	9,24
AD-397234	100,3	39,9	93,7	7,8	51,88	13,54	80,77	2,1
AD-397237	36,2	28,6	49,5	14	32,83	17,93	51,76	10,71
AD-397235	58	20,9	76,2	8	41,15	19,69	73,72	6
AD-397262	22,1	6,9	51,8	16,2	61,74	5,34	65,6	14,12
AD-397263	19,9	8	57,9	6,1	59,09	7,38	82,09	11,31
AD-397189	17	5,1	56,2	9,5	49,48	18,93	73,89	5,4
AD-397198	19,8	2,4	38,8	9,1	50,52	28,37	62,16	9,56
AD-397206	18,8	1,7	41	12,6	62,65	21,77	61,59	8,42
AD-397238	16,3	2	61,5	27,8	71,66	9,3	86,52	7,97
AD-397239	34,6	11,4	101	22,8	74,11	7,37	91,24	4,34
AD-397252	23,1	7,5	93,8	3,1	55,54	4,89	75,74	5,31
AD-397249	35,6	4	104,9	10,9	70,19	3,96	97,86	6,43
AD-397253	29,6	5,5	44,6	19,2	66,41	8,65	66,4	6,46
AD-397217	11,5	6,3	102,4	20,9	18,85	3,87	98,69	3,04
AD-397213	7,3	1,9	79,4	21,9	10,91	2,81	87,03	4,86
AD-397228	68,7	66,7	43,2	9,3	23,79	8,45	53,36	3,55
AD-397229	3,9	0,3	15,8	9,4	1,67	1,35	31,6	5,21
AD-397208	18,2	3,9	96,2	27,2	37,55	9,28	97,91	5,09
AD-397218	35	14,6	106	20,7	30,88	7,34	101,82	3,13
AD-397264	4,2	2,2	98	12,9	19,97	2,06	104,79	4,61
AD-397265	3	2,3	81,2	7,8	5,98	4,03	84,1	8,97
AD-397209	10,9	9,3	90,5	22,2	17,18	3,16	81,66	5,17
AD-397192	4,7	1,8	80,6	13	6,51	1,99	95,04	4,22
AD-397210	22,6	6,4	83,6	24,7	6,55	1,38	82,6	3,83
AD-397219	10,2	3,6	101,8	21,8	16,76	3,62	87,34	4,87
AD-397214	5,8	0,9	34,4	14,3	12,78	5,24	54,95	18,66
AD-397199	62,2	14,3	63,4	35	87,69	22,23	85,84	4,93
AD-397220	5,2	0,5	99,2	18,2	5,91	1,12	91,13	2,97
AD-397230	6,3	3,9	61,5	23,1	5,51	3,99	77,38	3,26
AD-397221	10,5	3,4	111,2	42,5	24,53	4,87	93,86	3,22
AD-397215	14,3	2,9	80,7	40	44,04	14,01	91,83	10,03
AD-397231	17,1	3,2	108,7	19,6	21,54	1,56	79,31	4,22
AD-397193	3,3	0,3	93,1	21,6	12,76	1,97	93,03	6,46
AD-397190	2,7	0,5	27,8	13,5	3,63	2,79	45,56	7,21
AD-397222	62,9	9,1	57,2	17	25,04	11,48	80,41	4,04
AD-397200	8,6	8,2	89,6	18,6	9,63	1,79	88,31	6,27
AD-397201	85,2	40,7	106	17,5	41,76	9,95	105,41	3,36
AD-397194	35,4	12,2	92	8,3	51,26	11,38	107,07	3,23
AD-397248	7,8	1,1	97,5	17,7	17,64	1,67	103,37	4,94
AD-397207	6,9	4	59,5	39,1	6,28	2,65	82,18	8,76
AD-397211	18,2	8,6	101,1	20,6	14,71	4,06	96,99	2,56
AD-397243	2,2	1,5	63,1	11,2	0,6	0,32	55,57	2,17
AD-397246	1,5	0,6	46,6	22,5	0,86	0,64	63,09	3,39
AD-397223	46,8	15,8	63,3	17,2	9,73	2,48	73,44	2,51

AD-397202	32,5	7,6	103,4	25,9	20,68	4,37	95,57	5,11
AD-397256	2,1	0,7	71,4	8	1,77	1,21	79,93	1,89
AD-397257	2,4	0,7	76,1	23,3	5,45	2,7	84,43	7,45
AD-397258	0,9	0,2	45,4	8,3	0,63	0,4	55,81	5,17
AD-397250	0,8	0,1	54,9	11,3	0,52	0,23	46,87	3,19
AD-397244	2,2	1,2	74,2	12	1,87	1,87	67,15	3,5

Как указано в таблице 4 выше, явно предполагается, что любые средства для RNAi, имеющие целевые последовательности, которые полностью находятся в пределах следующих диапазонов положений NM_001198823.1, вероятно, будут проявлять устойчивый ингибирующий эффект в отношении APP: положения 251-284 APP NM_001198823.1; положения 362-404 APP NM_001198823.1; положения 471-510 APP NM_001198823.1; положения 532-587 APP NM_001198823.1; положения 601-649 APP NM_001198823.1; положения 633-662 APP NM_001198823.1; положения 1351-1388 APP NM_001198823.1; положения 1609-1649 APP NM_001198823.1; положения 1675-1698 APP NM_001198823.1; положения 1752-1787 APP NM_001198823.1; положения 2165-2217 APP NM_001198823.1; положения 2280-2344 APP и положения 2403-2431 APP NM_001198823.1.

Пример 2. Оценка средств для RNAi in vivo

Выбранные нацеливающиеся на APP средства для RNAi оценивали в отношении эффективности in vivo в соответствующих скринингах для подтверждения механизма действия и идентификации лидерных последовательностей для нокдауна APP человека у мышей с введенным AAV. Выбранные средства для RNAi для таких исследований включали AD-392911, AD-392912, AD-392911, AD-392912, AD-392913, AD-392843, AD-392844, AD-392824, AD-392704, AD-392790, AD-392703, AD-392866, AD-392927, AD-392916, AD-392714 и AD-392926, имеющие последовательности, указанные в таблице 2A выше, соответствующие немодифицированным последовательностям, показанным в таблице 3 выше и графически изображенным на фиг. 1A и фиг. 1B, при этом на каждом средстве для RNAi, протестированном в данном примере, дополнительно присутствовал трехантенный фрагмент GalNAc, присоединенный к 3′-остатку смысловой нити, с целью облегчения нацеливания на печень таких средств для RNAi при подкожном введении мышам (в случае интратекального введения, что очевидно, предусматриваются средства, не содержащие конъюгированного фрагмента GalNAc).

В таких исследованиях вектор AAV, несущий APP Homo sapiens, вводили внутривенно самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель, и через 14 дней после введения AAV вводили подкожной инъекцией выбранное средство для RNAi или контрольное средство в дозе 3 мг/кг мышам (n = 3 на группу), при этом мышей умерщвляли и оценивали уровни мРНК APP в печени через 14 дней после подкожной инъекции средства для мРНК или контроля. Значимые уровни нокдауна мРНК APP человека *in vivo* в печени наблюдали для всех протестированных средств для RNAi по сравнению с PBS-контролем и контролем без воздействия (только с AAV), при этом особенно устойчивые уровни нокдауна наблюдали, например, в случае AD-392911, AD-392912, AD-392911, AD-392912, AD-392913, AD-392843, AD-392844, AD-392824, AD-392866, AD-392927, AD-392916, AD-392714 и AD-392926 (фиг. 2A и фиг. 2B). Результаты, использованные для получения фиг. 2A и фиг. 2B, в табличном виде представлены в таблице 8.

Таблица 8. Результаты скрининга в отношении нокдауна hsAPP *in vivo* (3 мг/кг, день 14, печень)

Обработка	% оставшейся мРНК	станд. откл.
PBS	100,00	15,77
без воздействия (только с AAV)	104,17	1,89
AD-392911	53,75	8,76
AD-392912	46,47	14,18
AD-392913	42,34	7,95
AD-392843	27,25	0,46
AD-392844	44,25	9,04
AD-392824	42,64	0,87
AD-392704	72,99	8,76
AD-392790	72,71	11,66
AD-392703	69,60	4,70
AD-392866	35,94	23,08
AD-392927	38,91	10,60
AD-392916	43,27	7,17
AD-392714	58,08	9,55
AD-392926	50,26	10,29

Пример 3. Идентификация высокоактивных siRNA для APP человека, которые предназначены для борьбы с наследственной церебральной амилоидной ангиопатии (hCAA)

Наследственную церебральную амилоидную ангиопатию (hCAA) вызывают аутосомно-доминантные мутации в гене, кодирующем белок-предшественник амилоида (APP) (Van Etten *et al.* 2016 *Neurology*). При данном заболевании бета-амилоид, образующийся в нейронах, откладывается в сосудах, вызывая значительные структурные изменения и отчетливое двуствольное строение сосудов. hCAA, по-видимому, представляет собой ангиопатию в относительно чистом виде с минимальным присутствием паренхиматозных бляшек или клубков тау-белка (Natte *et al.* 2012 *Annals of Neurology*). В конечном итоге повышенное отложение бета-амилоида приводит к микрокровоизлияниям, деменции и инсульту. hCAA представляет собой быстро прогрессирующее заболевание с ожидаемой продолжительностью жизни 7-10 лет после появления симптомов (Charidimou A *et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 124-137). Как отмечалось в данном документе, в настоящее время отсутствуют виды терапии, модифицирующие заболевание. В настоящем изобретении комбинирование стабильных конструкций siRNA с альтернативными стратегиями конъюгации обеспечило эффективный длительный сайленсинг по всей ЦНС после однократного интратекального введения, при этом 95% нокдаун мишени наблюдали в течение трех месяцев.

Скрининг на клетках Be(2)C и скрининги в печени in vivo

Чтобы идентифицировать высокоактивные siRNA для hAPP, siRNA сначала подвергали скринингу на клетках Be(2)C *in vitro*. Как показано на фиг. 3A и фиг. 3B, свыше 300 siRNA трансфицировали в клетки Be(2)C при концентрациях, составляющих 10 нМ (фиг. 3B) и 0,1 нМ (данные не показаны), а процент оставшейся мРНК анализировали с помощью qPCR. Затем проводили скрининг *in vivo* в печени мышей, которым вводили AAV-hAPP, для выявления соединений, способных приводить к нокдауну APP человека. siRNA для APP, содержащие GalNAc, разработанные для нацеливания на ORF hAPP или 3′ UTR hAPP, вводили подкожно в дозе 3 мг/кг (как показано на фиг. 2A и 2B соответственно). Выбранную подгруппу соединений затем преобразовывали в конъюгаты для ЦНС и использовали как в исследованиях по поиску лидерных последовательностей на отличных от человека приматах, так и на моделях заболевания

у грызунов с использованием интратекального (IT) введения. Как отмечалось выше, особенно устойчивые уровни нокдауна наблюдали, например, в случае AD-392911, AD-392912, AD-392911, AD-392912, AD-392913, AD-392843, AD-392844, AD-392824, AD-392866, AD-392927, AD-392916, AD-392714 и AD-392926 (фиг. 2A и фиг. 2B).

siRNA для APP, трансфицированную из расчета 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ в нейроны Be(2)C, оценивали в отношении осуществления нокдауна мРНК APP, а также уровней растворимых AAPα/β, через 24 и 48 часов после трансфекции (см., например, фиг. 4A, фиг. 4B и фиг. 4C). Зависимый от концентрации нокдаун мРНК APP наблюдали для обоих представляющих интерес siRNA, приведенных в качестве примера (например, siRNA 1 и siRNA 2, показанных на фиг. 4A-4C). Кроме того, снижение клеточного APP соответствовало до 99% нокдауну растворимых AAP α/β в нейроне Be(2)C в течение 48 часов.

Пример 4. Интратекальное (IT) введение дозы приводило к доставке siRNA APP по всему спинному и головному мозгу у отличных от человека приматов

ИССЛЕДОВАНИЯ НА ОТЛИЧНЫХ ОТ ЧЕЛОВЕКА ПРИМАТАХ

СОСТАВЛЕНИЕ ДОЗЫ И ПОДГОТОВКА

Информация о тестируемых олигонуклеотидах и носителях

Тестируемые олигонуклеотиды: AD-454972
AD-454973
AD-454842
AD-454843
AD-454844

Современное состояние научных знаний и применимые руководства, цитируемые ранее в данном протоколе, не предоставляют приемлемых альтернатив, представляющих собой исследования *in vitro* или иные, которые могли бы заменить использование живых животных для достижения цели данного исследования. Развитие знаний, необходимых для улучшения состояния здоровья и самочувствия людей, а также других животных, требует экспериментов *in vivo* с использованием самых разных видов животных. Животные в целом необходимы для исследований и тестирования, поскольку они наилучшим образом отражают динамические взаимодействия между

различными клетками, тканями и органами, составляющими организм человека. Собака породы бигль представляет собой обычную отличную от грызунов модель, используемую для оценки токсичности различных тестируемых препаратов, для которой существует большая историческая база данных. Однако обезьяна также представляет собой животную модель, используемую для оценки токсичности. Для использования в этом исследовании специально выбрали обезьяну, поскольку она является фармакологически наиболее подходящим видом. siRNA в тестируемых олигонуклеотидах направленапротив целевой последовательности мРНК белка-предшественника амилоида (APP) у обезьян и людей.

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа	Обработка	Уровень дозы (фиксированная доза, мг/животное)	Объем дозы (мл)	Концентрация дозы (мг/мл)	Количество животных (всего)	Вскрытие (день 29)	Вскрытие (день 85)
1	AD-454972	72	2,4	30	5	3	2
2	AD-454973	72	2,4	30	5	3	2
3	AD-454842	72	2,4	30	5	3	2
4	AD-454843	72	2,4	30	5	3	2
5	AD-454844	72	2,4	30	5	3	2
6*	Без обработки	0	0	0	2	2	0
*Использовали для сбора тканей, чтобы определить уровни APP в нормальных тканях, CSF и плазме крови у яванских макаков. Животных из групп 1-5 с неудачным проведением интратекальной канюляции можно было заменить на животных, распределенных в группу 6, при условии, что им не вводили олигонуклеотид. Животных вскрывали в день 29 день или раньше.							

Последовательность и структура олигонуклеотидов, используемых в вышеупомянутых исследованиях на отличных от человека приматах, более подробно описаны в таблице 9 ниже.

Таблица 9.

Средство	Нить (мишень)	Последовательность олигонуклеотида	SEQ ID NO:	Последовательность транскрипта	SEQ ID NO:
AD-454972	Смысловая нить (APP)	usasuga(Ahd)GfuUfCfAfucaucaaasasa	1863	UAUGAAGUUCAUCAUCAAAAA	1864
	Антисмысловая нить (APP)	VPusUfsuuug(Agn)ugaugaAfcUfucauasusc	1865	UUUUUGAUGAUGAACUUCAUAUC	1866
AD-454973	Смысловая нить (APP)	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccusasa	1867	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	1868
	Антисмысловая нить (APP)	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	1869	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	1870
AD-454842	Смысловая нить (APP)	ususugu(Ghd)UfaCfUfGfuaaagaaususa	1871	UUUGUGUACUGUAAAGAAUUA	1872
	Антисмысловая нить (APP)	VPusAfsauuc(Tgn)uuacagUfaCfacaaasasc	1873	UAAUUCTUUACAGUACACAAAAC	1874
AD-454843	Смысловая нить (APP)	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucuscsa	1875	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	1876
	Антисмысловая нить (APP)	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	1877	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	1878
AD-454844	Смысловая нить (APP)	asasaau(Chd)CfaAfCfCfuacaaguuscsa	1879	AAAAUCCAACCUACAAGUUCA	1880
	Антисмысловая нить (APP)	VPusGfsaacu(Tgn)guagguUfgGfauuuuscsg	1881	UGAACUTGUAGGUUGGAUUUUCG	1882

Пояснения к таблице 9: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Ниже приведены неограничивающие примеры нокдауна биомаркера в CSF и мРНК в ткани под действием интратекальной (IT) инъекции в дозе 72 мг лекарственного средства в ткани ЦНС яванских макаков. Однократную IT инъекцию в дозе 72 мг представляющей интерес siRNA для APP, вводили с помощью подкожной иглы яванским макакам в поясничную цистерну между L2/L3 или L4/L5 (см. Материалы и методы ниже). Как показано на фиг. 5A, оценивали 5 соединений и в каждом эксперименте использовали по 5 животных. Собранные ткани включали спинной мозг (поясничный, грудной и шейный отделы) и головной мозг (префронтальная кора, височная кора, мозжечок, ствол мозга, гиппокамп и полосатое тело). Кроме того, собранные жидкости включали как спинномозговую жидкость (CSF), так и плазму крови. Уровни лекарственных средств и нокдаун мРНК оценивали в день 29 после введения дозы. Как показано на фиг. 5B, APPα/β, а также бета-амилоид 38, 40 и 42 служили циркулирующими биомаркеров взаимодействия с мишенью в CSF и их оценивали в дни 8, 15 и 29 после введения дозы. Нокдаун в ткани соответствовал сайленсингу биомаркеров взаимодействия с мишенью в CSF уже через 7 дней после введения дозы. Как показано на фиг. 5C, IT введение дозы приводило к достаточной степени доставки siRNA в спинной мозг и головной мозг, чтобы привести к нокдауну мРНК APP на тканевом уровне. Уровни тестируемых лекарственных средств оценивали с помощью масс-спектрометрии, и они показаны на фиг. 5D. В итоге, на фиг. 5A-5D показана корреляция между уровнями биомаркеров в CSF, нокдауном мРНК и доставкой в ЦНС лекарственного средства, представляющего собой siRNA для APP, AD-454972. Таким образом, в частности, обнаружили, что уровни биомаркеров в CSF и нокдаун мРНК в ткани демонстрируют быстрое, устойчивое и продолжительное снижение в ЦНС в ответ на уровни лекарственного средства, представляющего собой конъюгат siRNA. На фиг. 6 продемонстрировано, что для биомаркеров взаимодействия с мишенью продолжительный фармакодинамический эффект в CSF наблюдали через 2-3 месяца после введения дозы AD-454972.

На фиг. 7A показаны результаты воздействия AD-454842 в отношении sAPPα/β в CSF, в то время как на фиг. 7B показаны уровни тестируемого лекарственного средства, представляющего собой AD-454842, в ткани согласно оценке с помощью масс-спектрометрии. В итоге, на фиг. 7A-7B показано, что уровни биомаркеров в CSF коррелируют с уровнями лекарственного средства в ЦНС в случае AD-454842, и это

приводит к значимому снижению содержания sAPP у животных с более высокими уровнями лекарственного средства в тканях.

На фиг. 8A показаны результаты воздействия AD-454843 в отношении sAPP α/β и разновидностей бета-амилоида соответственно в ЦНС. Как показано на фиг. 8B, IT введение дозы приводило к достаточной степени доставки siRNA в спинной мозг, гиппокамп и области коры головного мозга, чтобы привести к нокдауну мРНК APP на тканевом уровне. Уровни тестируемых лекарственных средств оценивали с помощью масс-спектрометрии, и они показаны на фиг. 8C. Соответственно, на фиг. 8A-8C показана явная корреляция между уровнями биомаркеров в CSF, нокдауном мРНК и доставкой лекарственного средства, представляющего собой AD-454843.

На фиг. 9A-9B продемонстрирован продолжительный фармакодинамический эффект, наблюдаемый в CSF в отношении биомаркеров взаимодействия с мишенью через 2-3 месяца после введения дозы AD-454843. В день 85 после введения дозы у яванских макаков наблюдали до 80% нокдауна на уровне мРНК в ткани ЦНС.

На фиг. 10A-10C показана корреляция между уровнями биомаркеров в CSF, нокдауном мРНК и доставкой лекарственного средства, представляющего собой AD-454844. Уровни тестируемых лекарственных средств оценивали с помощью масс-спектрометрии, и они показаны на фиг. 10C.

На фиг. 11A-11C показано, что при оптимальной доставке лидерная последовательности siRNA для APP демонстрирует устойчивую активность. Например, результаты воздействия высоких уровней лекарственного средства на нокдаун мРНК и сайленсинг биомаркеров взаимодействия с мишенью показывают, что высокие уровни лекарственного средства в мкг/г в ткани коррелировали с 75-90% нокдауном в тканях ЦНС, таких как кора и спинной мозг. Неожиданным образом обнаружили, что при оптимальной доставке также продемонстрирован значительный нокдаун в полосатом теле.

На фиг. 12A показано среднее значение для 5 дуплексов; в общем, IT введение дозы приводило к достаточной степени доставке siRNA, за счет чего нокдаун мРНК APP осуществлялся на тканевом уровне на 60-75% в день 29. Кроме того, как показано на фиг. 12B, содержание растворимых APPα/β,, а также бета-амилоида 38, 40 и 42, снизилось в CSF на 75% в день 29.

Нокдаун мРНК APP в полосатом теле отличных от человека приматов в день 29 после введения дозы

Однократную интратекальную (IT) инъекцию в дозе 72 мг представляющей интерес siRNA для APP вводили с помощью подкожной иглы яванским макакам в поясничную цистерну между L2/L3 или L4/L5. В настоящем изобретении было обнаружен примечательный факт, что доставка соединения конъюгата siRNA приводила к нокдауну мРНК APP в пределах полосатого тела. Наблюдали, что к нокдауну мРНК APP в полосатом теле отличных от человека приматов в день 29 после введения дозы приводили следующие siRNA: AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843 и AD-454844 (как показано на фиг. 13A-13E).

Материалы и методы

Растворимый APP-альфа/растворимый APP-бета

Уровни sAPPα и sAPPβ в CSF определяли с использованием анализа MSD® MULTI-SPOT для sAPPα/sAPPβ, проводимого в 96-луночном планшете на основе иммунохимического сэндвич-анализа (№ по каталогу K15120E; Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд, США) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми модификациями. Стандарты, холостые образцы и образцы CSF отличных от человека приматов (8-кратное разведение) готовили с использованием 1% раствора блокатора A/TBST (предоставлен в наборе). Предварительно покрытый планшет (предоставлен в наборе) блокировали с помощью 3% раствора блокатора A/TBST из расчета 150 мкл/лунка при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании. После трех промывок с помощью 1x TBST в планшет добавляли подготовленный стандарт, холостые образцы и образцы CSF в двух повторностях из расчета 25 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После последующих промывок планшета добавляли детекторное антитело, приготовленное в 1% растворе блокатора A/TBST (50-кратное разведение), из расчета 50 мкл/лунка и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании. После промывок планшета в планшет добавляли 1X буфер для считывания T и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре (без встряхивания) перед проведением визуализации и анализа в QuickPlex Imager MSD.

Исходные данные анализировали с помощью SoftMax Pro версии 7.1 (Molecular Devices). Для моделирования индивидуальных калибровочных кривых и расчета концентрации аналитов в образцах использовали подгонку по 5-параметрической логистической кривой с функцией взвешивания $1/Y^2$.

Панель разновидностей бета-амилоида (Aβ40, Aβ38, Aβ42)

Уровни бета-амилоида (Aβ40, Aβ38, Aβ42) в CSF определяли с использованием анализа MSD® MULTI-SPOT V-Plex для панели 1 AB-пептидов, проводимого в 96-луночном планшете на основе иммунохимического сэндвич-анализа (№ по каталогу K15200E; Meso Scale Discovery, Роквилл, Мэриленд, США) в соответствии с протоколом производителя с некоторыми модификациями. Стандарты, холостые образцы и CSF отличных от человека приматов (8-кратное разведение) готовили с использованием разбавителя 35 (предоставлен в наборе). Детекторное антитело (поставляемое в концентрации 50X) готовили с рабочей концентрацией 1X в разбавителе 100 (предоставлен в наборе) в комбинации с 30 мкл блокатора Aβ40. Предварительно покрытый планшет (предоставлен в наборе) блокировали разбавителем 35 из расчета 150 мкл/лунка в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. После трех промывок с помощью 1x PBST в планшет добавляли подготовленный раствор детекторного антитела из расчета 25 мкл/лунка. После добавления подготовленных стандартов, холостых образцов и образцов в двух повторностях из расчета 25 мкл/лунка планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при встряхивании. После последующих промывок планшета добавляли 2X буфер для считывания T из расчета 150 мкл/лунка, и планшет сразу визуализировали и анализировали в QuickPlex Imager MSD.

Исходные данные анализировали с помощью SoftMax Pro версии 7.1 (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния, США). Для моделирования индивидуальных калибровочных кривых и расчета концентрации аналитов в образцах использовали подгонку по 4-параметрической логистической кривой с функцией взвешивания $1/Y^2$.

Метод масс-спектрометрии

Концентрации лекарственного средства в образцах плазмы крови, CSF и ткани ЦНС определяли количественно с использованием соответствующего требованиям метода LC-MS/MS. Вкратце, образцы тканей гомогенизировали в буфере для лизиса, затем

олигонуклеотиды экстрагировали из плазмы крови, CSF или тканевого лизата с помощью твердофазной экстракции и анализировали с использованием обращенно-фазовой ион-парной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, в режиме отрицательной ионизации. Измеряли концентрацию полноразмерной антисмысловой нити из дуплекса, дозу которого вводили. Концентрации лекарственного средства регистрировали как концентрации дуплекса на основе антисмысловой нити. Диапазон калибровки составлял 10-5000 нг/мл для образцов плазмы крови и CSF, и 100-50000 нг/г для образцов ткани ЦНС. Концентрации, которые согласно расчетам были ниже LLOQ, регистрировали как <LLOQ. В качестве внутреннего стандарта использовали аналогичный дуплекс с отличающейся молекулярной массой.

Определение нокдауна мРНК с помощью метода qPCR

Общую РНК выделяли из образцов ткани головного мозга и спинного мозга крыс с использованием мини-набора miRNeasy (Qiagen, № по каталогу 217004) в соответствии с инструкциями производителя. После выделения РНК подвергали обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы SuperScript™ IV VILO™ (Thermo Fisher Scientific). Количественный ПЦР-анализ выполняли с использованием системы для ПЦР в режиме реального времени ViiA7 от Thermo Fisher Scientific, Уолтхэм, Массачусетс 02451, США (№ по каталогу 4453537) с универсальным мастер-миксом для ПЦР Taqman Fast (Applied Biosystems, № по каталогу 4352042), предварительно валидированными анализами генной экспрессии Taqman (Thermo Fisher Scientific) для белка-предшественника бета-амилоида (APP) (Mf01552291_m1) и пептидилпролилизомеразы B (PPIB) (Mf02802985_m1).

Относительное снижение мРНК APP рассчитывали с использованием сравнительного метода расчета значений порогового цикла (Ct). Во время qPCR прибор устанавливает исходный уровень, соответствующий экспоненциальной фазе кривой амплификации, и присваивает значение Ct на основе точки пересечения исходного уровня с кривой амплификации. Снижение мРНК APP нормализовали по отношению к экспериментальной необработанной контрольной группе в виде процентной доли для каждой соответствующей группы с использованием значений Ct в соответствии со следующими расчетами:

$\Delta Ct_{App} = Ct_{App} - Ct_{Ppib}$

$\Delta\Delta Ct_{App} = \Delta Ct_{App} - \Delta Ct_{\text{среднее необработанной контрольной группы}}$

Относительный уровень мРНК = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Пример 5. Конструирование, синтез и скрининг *in vitro* дополнительных средств для RNAi на линиях клеток Cos-7, Be(2)-C и Neuro-2a

В данном примере описаны способы конструирования, синтеза, отбора и скрининга *in vitro* дополнительных средств для RNAi APP в клетках Cos-7 (вектор с двойной люциферазой psiCHECK2), Be(2)-C и Neuro-2a.

Источники реагентов

Если в данном документе конкретно не указан источник реагента, такой реагент можно приобрести у любого поставщика реагентов для молекулярной биологии, при этом он должен характеризоваться качеством/чистотой, стандартным для применения в молекулярной биологии.

Культура клеток и выполнение трансфекции

Клетки Cos-7 (ATCC) трансфицировали путем внесения в 384-луночный планшет по 5 мкл вектора psiCHECK2 с интроном C9orf72 1 (Blue Heron Biotechnology), разбавленного из расчета 1 нг/мкл в Opti-MEM, 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine 2000 на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, № по кат. 11668-019) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку, с 4 повторностями для каждого дуплекса, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси на основе siRNA добавляли 35 мкл среды Игла в модификации Дульбекко (ThermoFisher), содержащей ~5 x 10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 часов, а затем проводили измерения активности люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Renilla (слитой с целевой последовательностью). Эксперимент выполняли с тремя дозами при концентрации 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Клетки Be(2)-C (ATCC) трансфицировали путем внесения в 384-луночный планшет по 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку, с 4 повторностями для

каждого дуплекса, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси на основе siRNA добавляли 40 мкл 1:1 смеси минимальной поддерживающей среды и среды F12 (ThermoFisher), содержащей ~5 x10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 часов перед выделением РНК. Эксперименты выполняли с двумя дозами при концентрации 10 нМ и 0,1 нМ.

Клетки Neuro-2a(ATCC) трансфицировали путем внесения в 384-луночный планшет по 4,9 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку, с 4 повторностями для каждого дуплекса, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси на основе siRNA добавляли 40 мкл минимальной поддерживающей среды (ThermoFisher), содержащей ~5 x 10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 часов перед выделением РНК. Эксперименты выполняли с двумя дозами при концентрации 10 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS

РНК выделяли с использованием протокола для автоматизированной платформы BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, № по кат. 61012). Вкратце, в планшет с клетками вносили 70 мкл буфера для лизиса/связывания и 10 мкл буфера для лизиса, содержащего 3 мкл магнитных гранул. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем магнитные гранулы захватывали, а супернатант удаляли. Затем связанную с гранулами РНК промывали 2 раза с помощью 150 мкл промывочного буфера А и однократно с помощью промывочного буфера В. Затем гранулы промывали с помощью 150 мкл элюирующего буфера, повторно захватывали и удаляли супернатант.

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

10 мкл мастер-микса, содержащего 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл 10x случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H2O на реакцию, добавляли к РНК, выделенной, как описано выше. Планшеты

герметизировали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем в течение 2 ч при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) добавляли либо к 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (4326317E) и 0,5 мкл зонда для C9orf72 человека (Hs00376619_m1, Thermo), либо к 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH мыши (4352339E) и 0,5 мкл зонда для C9orf72 мыши (Mm01216837_m1, Thermo) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза и данные нормализовали относительно клеток, трансфицированных с помощью ненацеливающейся контрольной siRNA. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода ΔΔCt и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью ненацеливающейся контрольной siRNA.

Дополнительные последовательности APP-олигонуклетидов

Дополнительные модифицированные и целевые последовательности APP перечислены с таблицы 10 по таблицу 16B.

Таблица 10. Дополнительные модифицированные последовательности APP человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-506935.2	asasagagCfaAfAfAfcuauucagauL96	1883	asUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	1884	AGAAAGAGCAAAACUAUUCAGAU	1885
AD-507065.2	ususggccAfaCfAfUfgauuagugauL96	1886	asUfscacUfaAfUfcaugUfuGfgccaasgsa	1887	UCUUGGCCAACAUGAUUAGUGAA	1888
AD-507159.2	uscsugggUfuGfAfCfaaauaucaauL96	1889	asUfsugaUfaUfUfugucAfaCfccagasasc	1890	GUUCUGGGUUGACAAAUAUCAAG	1891
AD-507538.2	ususuaugAfuUfUfAfcucauuaucuL96	1892	asGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	1893	GUUUUAUGAUUUACUCAUUAUCG	1894
AD-507624.2	asusgccuGfaAfCfUfugaauuaauuL96	1895	asAfsuuaAfuUfCfaaguUfcAfggcauscsu	1896	AGAUGCCUGAACUUGAAUUAAUC	1897
AD-507724.2	asgsaugcCfuGfAfAfcuugaauuauL96	1898	asUfsaauUfcAfAfguucAfgGfcaucusasc	1899	GUAGAUGCCUGAACUUGAAUUAA	1900
AD-507725.2	gscscugaAfcUfUfGfaauuaauccuL96	1901	asGfsgauUfaAfUfucaaGfuUfcaggcsasu	1902	AUGCCUGAACUUGAAUUAAUCCA	1903
AD-507789.2	gsusgguuUfgUfGfAfcccaauuaauL96	1904	asUfsuaaUfuGfGfgucaCfaAfaccacsasa	1905	UUGUGGUUUGUGACCCAAUUAAG	1906
AD-507874.2	csasgaugCfuUfUfAfgagagauuuuL96	1907	asAfsaauCfuCfUfcuaaAfgCfaucugsasa	1908	UUCAGAUGCUUUAGAGAGAUUUU	1909
AD-507928.2	uscsuugcCfuAfAfGfuauuccuuuuL96	1910	asAfsaagGfaAfUfacuuAfgGfcaagasgsa	1911	UCUCUUGCCUAAGUAUUCCUUUC	1912
AD-507949.2	ususgcugCfuUfCfUfgcuauauuuuL96	1913	asAfsaauAfuAfGfcagaAfgCfagcaasusc	1914	GAUUGCUGCUUCUGCUAUAUUUG	1915

Пояснения к таблице 10: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Таблица 11. Дополнительные немодифицированные последовательности APP человека; нацеливание на NM_000484.3 и NM_201414.2

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Название источника (диапазон)	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Название источника (диапазон)	Перекрестно-реактивный вид
AD-506935.2	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAU	1916	NM_000484.3_1902-1922_s (1902-1922)	AUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	1917	NM_201414.2_1675-1697_as (1900-1922)	НЕИЗВ
AD-507065.2	UUGGCCAACAUGAUUAGUGAU	1918	NM_201414.2_1704-1724_A21U_s (1704-1724)	AUCACUAAUCAUGUUGGCCAAGA	1919	NM_201414.2_1702-1724_U1A_as (1702-1724)	НЕИЗВ
AD-507159.2	UCUGGGUUGACAAAUAUCAAU	1920	NM_000484.3_2166-2186_G21U_s (2166-2186)	AUUGAUAUUUGUCAACCCAGAAC	1921	NM_201414.2_1939-1961_C1A_as (2164-2186)	НЕИЗВ
AD-507538.2	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCU	1922	NM_000484.3_2613-2633_G21U_s (2613-2633)	AGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	1923	NM_201414.2_2386-2408_C1A_as (2611-2633)	НЕИЗВ
AD-507624.2	AUGCCUGAACUUGAAUUAAUU	1924	NM_000484.3_2665-2685_C21U_s (2665-2685)	AAUUAAUUCAAGUUCAGGCAUCU	1925	NM_201414.2_2438-2460_G1A_as (2663-2685)	НЕИЗВ
AD-507724.2	AGAUGCCUGAACUUGAAUUAU	1926	NM_201414.2_2438-2458_A21U_s (2438-2458)	AUAAUUCAAGUUCAGGCAUCUAC	1927	NM_201414.2_2436-2458_U1A_as (2436-2458)	НЕИЗВ
AD-507725.2	GCCUGAACUUGAAUUAAUCCU	1928	NM_201414.2_2442-2462_A21U_s (2442-2462)	AGGAUUAAUUCAAGUUCAGGCAU	1929	NM_201414.2_2440-2462_U1A_as (2440-2462)	НЕИЗВ
AD-507789.2	GUGGUUUGUGACCCAAUUAAU	1930	NM_000484.3_2853-2873_G21U_s (2853-2873)	AUUAAUUGGGUCACAAACCACAA	1931	NM_201414.2_2626-2648_C1A_as (2851-2873)	НЕИЗВ
AD-507874.2	CAGAUGCUUUAGAGAGAUUUU	1932	NM_000484.3_3006-3026_s (3006-3026)	AAAAUCUCUCUAAAGCAUCUGAA	1933	NM_201414.2_2779-2801_as (3004-3026)	НЕИЗВ

AD-507928.2	UCUUGCCUAAGUAUUCCUUUU	1934	NM_201414.2_2718-2738_C21U_s (2718-2738)	AAAAGGAAUACUUAGGCAAGAGA	1935	NM_201414.2_2716-2738_G1A_as (2716-2738)	НЕИЗВ
AD-507949.2	UUGCUGCUUCUGCUAUAUUUU	1936	NM_201414.2_2831-2851_G21U_s (2831-2851)	AAAAUAUAGCAGAAGCAGCAAUC	1937	NM_201414.2_2829-2851_C1A_as (2829-2851)	НЕИЗВ

Таблица 12. Дополнительные модифицированные последовательности APP человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO
AD-738012.1	csgscuu(Uhd)CfuAfCfAfcuguauuacaL96	1938	VPusGfsuaaUfaCfAfguguAfgAfaagcgsasu	1939
AD-738013.1	gscsuuu(Chd)UfaCfAfCfuguauuacaaL96	1940	VPusUfsguaAfuAfCfagugUfaGfaaagcsgsa	1941
AD-738014.1	ususcua(Chd)AfcUfGfUfauuacauaaaL96	1942	VPusUfsuauGfuAfAfuacaGfuGfuagaasasg	1943
AD-738015.1	ususucu(Ahd)CfaCfUfGfuauuacauaaL96	1944	VPusUfsaugUfaAfUfacagUfgUfagaaasgsc	1945
AD-738016.1	asusuua(Ghd)CfuGfUfAfucaaacuagaL96	1946	VPusCfsuagUfuUfGfauacAfgCfuaaaususc	1947
AD-738017.1	ususccu(Ghd)AfuCfAfCfuaugcauuuaL96	1948	VPusAfsaauGfcAfUfagugAfuCfaggaasasg	1949
AD-738018.1	gsusgcu(Ghd)UfaAfCfAfcaaguagauaL96	1950	VPusAfsucuAfcUfUfguguUfaCfagcacsasg	1951
AD-738019.1	ususuag(Chd)UfgUfAfUfcaaacuaguaL96	1952	VPusAfscuaGfuUfUfgauaCfaGfcuaaasusu	1953
AD-738020.1	ususucc(Uhd)GfaUfCfAfcuaugcauuaL96	1954	VPusAfsaugCfaUfAfgugaUfcAfggaaasgsg	1955
AD-738021.1	asasugg(Ghd)UfuUfUfGfuguacuguaaL96	1956	VPusUfsacaGfuAfCfacaaAfaCfccauusasa	1957
AD-738022.1	asusugu(Ahd)CfaGfAfAfucauugcuuaL96	1958	VPusAfsagcAfaUfGfauucUfgUfacaauscsa	1959
AD-738023.1	ususgua(Chd)AfgAfAfUfcauugcuuaaL96	1960	VPusUfsaagCfaAfUfgauuCfuGfuacaasusc	1961
AD-738024.1	ususacu(Ghd)UfaCfAfGfauugcugcuaL96	1962	VPusAfsgcaGfcAfAfucugUfaCfaguaasasa	1963
AD-738025.1	asusaug(Chd)UfgAfAfGfaaguacgucaL96	1964	VPusGfsacgUfaCfUfucuuCfaGfcauaususg	1965

AD-738026.1	ascscau(Uhd)GfcUfUfCfacuacccauaL96	1966	VPusAfsuggGfuAfGfugaaGfcAfauggususu	1967
AD-738027.1	csusgug(Chd)UfgUfAfAfcacaaguagaL96	1968	VPusCfsuacUfuGfUfguuaCfaGfcacagscsu	1969
AD-738028.1	usgscug(Uhd)AfaCfAfCfaaguagaugaL96	1970	VPusCfsaucUfaCfUfugugUfuAfcagcascsa	1971
AD-738029.1	ascsagc(Uhd)GfuGfCfUfguaacacaaaL96	1972	VPusUfsuguGfuUfAfcagcAfcAfgcugucscsa	1973
AD-738030.1	gscsugu(Ahd)AfcAfCfAfaguagaugcaL96	1974	VPusGfscauCfuAfCfuuguGfuUfacagcsasc	1975
AD-738031.1	uscsaaa(Chd)UfaGfUfGfcaugaauagaL96	1976	VPusCfsuauUfcAfUfgcacUfaGfuuugasusa	1977
AD-738032.1	csasaac(Uhd)AfgUfGfCfaugaauagaaL96	1978	VPusUfscuaUfuCfAfugcaCfuAfguuugsasu	1979
AD-738033.1	usgscag(Ghd)AfuGfAfUfuguacagaaaL96	1980	VPusUfsucuGfuAfCfaaucAfuCfcugcasgsa	1981
AD-738034.1	gscsagg(Ahd)UfgAfUfUfguacagaauaL96	1982	VPusAfsuucUfgUfAfcaauCfaUfccugcsasg	1983
AD-738035.1	csasgga(Uhd)GfaUfUfGfuacagaaucaL96	1984	VPusGfsauuCfuGfUfacaaUfcAfuccugscsa	1985
AD-738036.1	usasuca(Ahd)AfcUfAfGfugcaugaauaL96	1986	VPusAfsuucAfuGfCfacuaGfuUfugauascsa	1987
AD-738037.1	ususugu(Ghd)CfcUfGfUfuuuaugugcaL96	1988	VPusGfscacAfuAfAfaacaGfgCfacaaasgsa	1989
AD-738038.1	ususgug(Chd)CfuGfUfUfuuaugugcaaL96	1990	VPusUfsgcaCfaUfAfaaacAfgGfcacaasasg	1991
AD-738039.1	csusgca(Ghd)GfaUfGfAfuuguacagaaL96	1992	VPusUfscugUfaCfAfaucaUfcCfugcagsasa	1993
AD-738040.1	csasggu(Chd)AfuGfAfGfagaaugggaaL96	1994	VPusUfscccAfuUfCfucucAfuGfaccugsgsg	1995
AD-738041.1	usasugu(Ghd)CfaCfAfCfauuaggcauaL96	1996	VPusAfsugcCfuAfAfugugUfgCfacauasasa	1997
AD-738042.1	usgsugc(Ahd)CfaCfAfUfuaggcauugaL96	1998	VPusCfsaauGfcCfUfaaugUfgUfgcacasusa	1999
AD-738043.1	gsgsaug(Ahd)UfuGfUfAfcagaaucauaL96	2000	VPusAfsugaUfuCfUfguacAfaUfcauccsusg	2001
AD-738044.1	ascscau(Chd)CfaGfAfAfcuggugcaaaL96	2002	VPusUfsugcAfcCfAfguucUfgGfaugguscsa	2003
AD-738045.1	usasugc(Uhd)GfaAfGfAfaguacguccaL96	2004	VPusGfsgacGfuAfCfuucuUfcAfgcauasusu	2005
AD-738046.1	asusgcu(Ghd)AfaGfAfAfguacguccgaL96	2006	VPusCfsggaCfgUfAfcuucUfuCfagcausasu	2007
AD-738047.1	asasacc(Ahd)UfuGfCfUfucacuacccaL96	2008	VPusGfsgguAfgUfGfaagcAfaUfgguuususg	2009
AD-738048.1	asascca(Uhd)UfgCfUfUfcacuacccaaL96	2010	VPusUfsgggUfaGfUfgaagCfaAfugguususu	2011

AD-397217.2	csasccg(Ahd)GfaGfAfGfaaugucccaaL96	2012	VPusUfsgggAfcAfUfucucUfcUfcggugscsu	2013
AD-738049.1	gsusugu(Ahd)UfaUfUfAfuucuuguggaL96	2014	VPusCfscacAfaGfAfauaaUfaUfacaacsusg	2015
AD-738050.1	ususaug(Uhd)GfcAfCfAfcauuaggcaaL96	2016	VPusUfsgccUfaAfUfguguGfcAfcauaasasa	2017
AD-738051.1	asusgug(Chd)AfcAfCfAfuuaggcauuaL96	2018	VPusAfsaugCfcUfAfauguGfuGfcacausasa	2019
AD-738052.1	gsusgca(Chd)AfcAfUfUfaggcauugaaL96	2020	VPusUfscaaUfgCfCfuaauGfuGfugcacsasu	2021
AD-738053.1	usgsauu(Ghd)UfaCfAfGfaaucauugcaL96	2022	VPusGfscaaUfgAfUfucugUfaCfaaucasusc	2023
AD-738054.1	gscsuuc(Ahd)CfuAfCfCfcaucgguguaL96	2024	VPusAfscacCfgAfUfggguAfgUfgaagcsasa	2025
AD-738055.1	ususuua(Uhd)GfuGfCfAfcacauuaggaL96	2026	VPusCfscuaAfuGfUfgugcAfcAfuaaaascsa	2027
AD-738056.1	csgscuu(Uhd)CfuAfCfAfcuguauuacaL96	2028	VPusGfsuaau(Agn)caguguAfgAfaagcgsasu	2029
AD-738057.1	gscsuuu(Chd)UfaCfAfCfuguauuacaaL96	2030	VPusUfsguaa(Tgn)acagugUfaGfaaagcsgsa	2031
AD-738058.1	ususcua(Chd)AfcUfGfUfauuacauaaaL96	2032	VPusUfsuaug(Tgn)aauacaGfuGfuagaasasg	2033
AD-738059.1	ususucu(Ahd)CfaCfUfGfuauuacauaaL96	2034	VPusUfsaugu(Agn)auacagUfgUfagaaasgsc	2035
AD-738060.1	asusuua(Ghd)CfuGfUfAfucaaacuagaL96	2036	VPusCfsuagu(Tgn)ugauacAfgCfuaaaususc	2037
AD-738061.1	ususccu(Ghd)AfuCfAfCfuaugcauuuaL96	2038	VPusAfsaaug(Cgn)auagugAfuCfaggaasasg	2039
AD-738062.1	gsusgcu(Ghd)UfaAfCfAfcaaguagauaL96	2040	VPusAfsucua(Cgn)uuguguUfaCfagcacsasg	2041
AD-738063.1	ususuag(Chd)UfgUfAfUfcaaacuaguaL96	2042	VPusAfscuag(Tgn)uugauaCfaGfcuaaasusu	2043
AD-738064.1	ususucc(Uhd)GfaUfCfAfcuaugcauuaL96	2044	VPusAfsaugc(Agn)uagugaUfcAfggaaasgsg	2045
AD-738065.1	asasugg(Ghd)UfuUfUfGfuguacuguaaL96	2046	VPusUfsacag(Tgn)acacaaAfaCfccauusasa	2047
AD-738066.1	ususacu(Ghd)UfaCfAfGfauugcugcuaL96	2048	VPusAfsgcag(Cgn)aaucugUfaCfaguaasasa	2049
AD-738067.1	asusugu(Ahd)CfaGfAfAfucauugcuuaL96	2050	VPusAfsagca(Agn)ugauucUfgUfacaauscsa	2051
AD-738068.1	ususgua(Chd)AfgAfAfUfcauugcuuaaL96	2052	VPusUfsaagc(Agn)augauuCfuGfuacaasusc	2053
AD-738069.1	asusaug(Chd)UfgAfAfGfaaguacgucaL96	2054	VPusGfsacgu(Agn)cuucuuCfaGfcauaususg	2055
AD-738070.1	ascscau(Uhd)GfcUfUfCfacuacccauaL96	2056	VPusAfsuggg(Tgn)agugaaGfcAfauggususu	2057

AD-738071.1	csusgug(Chd)UfgUfAfAfcacaaguagaL96	2058	VPusCfsuacu(Tgn)guguuaCfaGfcacagscsu	2059
AD-738072.1	usgscug(Uhd)AfaCfAfCfaaguagaugaL96	2060	VPusCfsaucu(Agn)cuugugUfuAfcagcascsa	2061
AD-738073.1	ascsagc(Uhd)GfuGfCfUfguaacacaaaL96	2062	VPusUfsugug(Tgn)uacagcAfcAfgcugusccsa	2063
AD-738074.1	gscsugu(Ahd)AfcAfCfAfaguagaugcaL96	2064	VPusGfscauc(Tgn)acuuguGfuUfacagcsasc	2065
AD-738075.1	uscsaaa(Chd)UfaGfUfGfcaugaauagaL96	2066	VPusCfsuauu(Cgn)augcacUfaGfuuugasusa	2067
AD-738076.1	csasaac(Uhd)AfgUfGfCfaugaauagaaL96	2068	VPusUfscuau(Tgn)caugcaCfuAfguuugsasu	2069
AD-738077.1	usgscag(Ghd)AfuGfAfUfuguacagaaaL96	2070	VPusUfsucug(Tgn)acaaucAfuCfcugcasgsa	2071
AD-738078.1	gscsagg(Ahd)UfgAfUfUfguacagaauaL96	2072	VPusAfsuucu(Ggn)uacaauCfaUfccugcsasg	2073
AD-738079.1	csasgga(Uhd)GfaUfUfGfuacagaaucaL96	2074	VPusGfsauuc(Tgn)guacaaUfcAfuccugscsa	2075
AD-738080.1	usasuca(Ahd)AfcUfAfGfugcaugaauaL96	2076	VPusAfsuuca(Tgn)gcacuaGfuUfugauascsa	2077
AD-738081.1	ususugu(Ghd)CfcUfGfUfuuuaugugcaL96	2078	VPusGfscaca(Tgn)aaaacaGfgCfacaaasgsa	2079
AD-738082.1	ususgug(Chd)CfuGfUfUfuuaugugcaaL96	2080	VPusUfsgcac(Agn)uaaaacAfgGfcacaasasg	2081
AD-738083.1	csusgca(Ghd)GfaUfGfAfuuguacagaaL96	2082	VPusUfscugu(Agn)caaucaUfcCfugcagsasa	2083
AD-738084.1	csasggu(Chd)AfuGfAfGfagaaugggaaL96	2084	VPusUfsccca(Tgn)ucucucAfuGfaccugsgsg	2085
AD-738085.1	usasugc(Uhd)GfaAfGfAfaguacguccaL96	2086	VPusGfsgacg(Tgn)acuucuUfcAfgcauasusu	2087
AD-738086.1	asusgcu(Ghd)AfaGfAfAfguacguccgaL96	2088	VPusCfsggac(Ggn)uacuucUfuCfagcausasu	2089
AD-738087.1	asasacc(Ahd)UfuGfCfUfucacuacccaL96	2090	VPusGfsggua(Ggn)ugaagcAfaUfgguuususg	2091
AD-738088.1	asascca(Uhd)UfgCfUfUfcacuacccaaL96	2092	VPusUfsgggu(Agn)gugaagCfaAfugguususu	2093
AD-738089.1	usasugu(Ghd)CfaCfAfCfauuaggcauaL96	2094	VPusAfsugcc(Tgn)aaugugUfgCfacauasasa	2095
AD-738090.1	usgsugc(Ahd)CfaCfAfUfuaggcauugaL96	2096	VPusCfsaaug(Cgn)cuaaugUfgUfgcacasusa	2097
AD-738091.1	gsgsaug(Ahd)UfuGfUfAfcagaaucauaL96	2098	VPusAfsugau(Tgn)cuguacAfaUfcauccsusg	2099
AD-738092.1	ascscau(Chd)CfaGfAfAfcuggugcaaaL96	2100	VPusUfsugca(Cgn)caguucUfgGfaugguscsa	2101
AD-738093.1	csasccg(Ahd)GfaGfAfGfaaugucccaaL96	2102	VPusUfsggga(Cgn)auucucUfcUfcggugscsu	2103

AD-738094.1	gsusugu(Ahd)UfaUfUfAfuucuuguggaL96	2104	VPusCfscaca(Agn)gaauaaUfaUfacaacsusg	2105
AD-738095.1	ususaug(Uhd)GfcAfCfAfcauuaggcaaL96	2106	VPusUfsgccu(Agn)auguguGfcAfcauaasasa	2107
AD-738096.1	asusgug(Chd)AfcAfCfAfuuaggcauuaL96	2108	VPusAfsaugc(Cgn)uaauguGfuGfcacausasa	2109
AD-738097.1	gsusgca(Chd)AfcAfUfUfaggcauugaaL96	2110	VPusUfscaau(Ggn)ccuaauGfuGfugcacsasu	2111
AD-738098.1	usgsauu(Ghd)UfaCfAfGfaaucauugcaL96	2112	VPusGfscaau(Ggn)auucugUfaCfaaucasusc	2113
AD-738099.1	gscsuuc(Ahd)CfuAfCfCfcaucgguguaL96	2114	VPusAfscacc(Ggn)auggguAfgUfgaagcsasa	2115
AD-738100.1	ususuua(Uhd)GfuGfCfAfcacauuaggaL96	2116	VPusCfscuaa(Tgn)gugugcAfcAfuaaaascsa	2117

Пояснения к таблице 12: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3м-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Таблица 13. Дополнительные немодифицированные последовательности APP человека; нацеливание на XM_005548887.2 и NM_001198823.1

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Название источника
AD-738012.1	CGCUUUCUACACUGUAUUACA	2118	UGUAAUACAGUGUAGAAAGCGAU	2119	XM_005548887.2_3401-3423_as
AD-738013.1	GCUUUCUACACUGUAUUACAA	2120	UUGUAAUACAGUGUAGAAAGCGA	2121	XM_005548887.2_3402-3424_as
AD-738014.1	UUCUACACUGUAUUACAUAAA	2122	UUUAUGUAAUACAGUGUAGAAAG	2123	NM_001198823.1_3306-3328_as
AD-738015.1	UUUCUACACUGUAUUACAUAA	2124	UUAUGUAAUACAGUGUAGAAAGC	2125	NM_001198823.1_3305-3327_as
AD-738016.1	AUUUAGCUGUAUCAAACUAGA	2126	UCUAGUUUGAUACAGCUAAAUUC	2127	XM_005548887.2_2837-2859_as

AD-738017.1	UUCCUGAUCACUAUGCAUUUA	2128	UAAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAG	2129	XM_005548887.2_3030-3052_as
AD-738018.1	GUGCUGUAACACAAGUAGAUA	2130	UAUCUACUUGUGUUACAGCACAG	2131	NM_001198823.1_2602-2624_C1A_as
AD-738019.1	UUUAGCUGUAUCAAACUAGUA	2132	UACUAGUUUGAUACAGCUAAAUU	2133	XM_005548887.2_2838-2860_as
AD-738020.1	UUUCCUGAUCACUAUGCAUUA	2134	UAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAGG	2135	XM_005548887.2_3029-3051_as
AD-738021.1	AAUGGGUUUUGUGUACUGUAA	2136	UUACAGUACACAAAACCCAUUAA	2137	XM_005548887.2_2813-2835_as
AD-738022.1	AUUGUACAGAAUCAUUGCUUA	2138	UAAGCAAUGAUUCUGUACAAUCA	2139	NM_001198823.1_3272-3294_as
AD-738023.1	UUGUACAGAAUCAUUGCUUAA	2140	UUAAGCAAUGAUUCUGUACAAUC	2141	NM_001198823.1_3273-3295_as
AD-738024.1	UUACUGUACAGAUUGCUGCUA	2142	UAGCAGCAAUCUGUACAGUAAAA	2143	XM_005548887.2_3113-3135_as
AD-738025.1	AUAUGCUGAAGAAGUACGUCA	2144	UGACGUACUUCUUCAGCAUAUUG	2145	XM_005548887.2_1740-1762_as
AD-738026.1	ACCAUUGCUUCACUACCCAUA	2146	UAUGGGUAGUGAAGCAAUGGUUU	2147	NM_001198823.1_2506-2528_G1A_as
AD-738027.1	CUGUGCUGUAACACAAGUAGA	2148	UCUACUUGUGUUACAGCACAGCU	2149	NM_001198823.1_2600-2622_as
AD-738028.1	UGCUGUAACACAAGUAGAUGA	2150	UCAUCUACUUGUGUUACAGCACA	2151	NM_001198823.1_2603-2625_G1A_as
AD-738029.1	ACAGCUGUGCUGUAACACAAA	2152	UUUGUGUUACAGCACAGCUGUCA	2153	NM_001198823.1_2596-2618_C1A_as
AD-738030.1	GCUGUAACACAAGUAGAUGCA	2154	UGCAUCUACUUGUGUUACAGCAC	2155	NM_001198823.1_2604-2626_G1A_as
AD-738031.1	UCAAACUAGUGCAUGAAUAGA	2156	UCUAUUCAUGCACUAGUUUGAUA	2157	NM_001198823.1_2742-2764_as
AD-738032.1	CAAACUAGUGCAUGAAUAGAA	2158	UUCUAUUCAUGCACUAGUUUGAU	2159	NM_001198823.1_2743-2765_as
AD-738033.1	UGCAGGAUGAUUGUACAGAAA	2160	UUUCUGUACAAUCAUCCUGCAGA	2161	NM_001198823.1_3263-3285_as

AD-738034.1	GCAGGAUGAUUGUACAGAAUA	2162	UAUUCUGUACAAUCAUCCUGCAG	2163	NM_001198823.1_3264-3286_G1A_as
AD-738035.1	CAGGAUGAUUGUACAGAAUCA	2164	UGAUUCUGUACAAUCAUCCUGCA	2165	NM_001198823.1_3265-3287_as
AD-738036.1	UAUCAAACUAGUGCAUGAAUA	2166	UAUUCAUGCACUAGUUUGAUACA	2167	NM_001198823.1_2740-2762_as
AD-738037.1	UUUGUGCCUGUUUUAUGUGCA	2168	UGCACAUAAAACAGGCACAAAGA	2169	NM_001198823.1_3070-3092_as
AD-738038.1	UUGUGCCUGUUUUAUGUGCAA	2170	UUGCACAUAAAACAGGCACAAAG	2171	NM_001198823.1_3071-3093_G1A_as
AD-738039.1	CUGCAGGAUGAUUGUACAGAA	2172	UUCUGUACAAUCAUCCUGCAGAA	2173	NM_001198823.1_3262-3284_as
AD-738040.1	CAGGUCAUGAGAGAAUGGGAA	2174	UUCCCAUUCUCUCAUGACCUGGG	2175	NM_001198823.1_1369-1391_as
AD-738041.1	UAUGUGCACACAUUAGGCAUA	2176	UAUGCCUAAUGUGUGCACAUAAA	2177	NM_001198823.1_3083-3105_as
AD-738042.1	UGUGCACACAUUAGGCAUUGA	2178	UCAAUGCCUAAUGUGUGCACAUA	2179	NM_001198823.1_3085-3107_as
AD-738043.1	GGAUGAUUGUACAGAAUCAUA	2180	UAUGAUUCUGUACAAUCAUCCUG	2181	NM_001198823.1_3267-3289_as
AD-738044.1	ACCAUCCAGAACUGGUGCAAA	2182	UUUGCACCAGUUCUGGAUGGUCA	2183	NM_001198823.1_424-446_C1A_as
AD-738045.1	UAUGCUGAAGAAGUACGUCCA	2184	UGGACGUACUUCUUCAGCAUAUU	2185	XM_005548887.2_1741-1763_as
AD-738046.1	AUGCUGAAGAAGUACGUCCGA	2186	UCGGACGUACUUCUUCAGCAUAU	2187	XM_005548887.2_1742-1764_as
AD-738047.1	AAACCAUUGCUUCACUACCCA	2188	UGGGUAGUGAAGCAAUGGUUUUG	2189	XM_005548887.2_2614-2636_as
AD-738048.1	AACCAUUGCUUCACUACCCAA	2190	UUGGGUAGUGAAGCAAUGGUUUU	2191	XM_005548887.2_2615-2637_as
AD-397217.2	CACCGAGAGAGAAUGUCCCAA	2192	UUGGGACAUUCUCUCUCGGUGCU	2193	NM_001198823.1_1351-1373_C1A_as
AD-738049.1	GUUGUAUAUUAUUCUUGUGGA	2194	UCCACAAGAAUAAUAUACAACUG	2195	XM_005548887.2_2906-2928_as

AD-738050.1	UUAUGUGCACACAUUAGGCAA	2196	UUGCCUAAUGUGUGCACAUAAAA	2197	NM_001198823.1_3082-3104_as
AD-738051.1	AUGUGCACACAUUAGGCAUUA	2198	UAAUGCCUAAUGUGUGCACAUAA	2199	NM_001198823.1_3084-3106_C1A_as
AD-738052.1	GUGCACACAUUAGGCAUUGAA	2200	UUCAAUGCCUAAUGUGUGCACAU	2201	NM_001198823.1_3086-3108_C1A_as
AD-738053.1	UGAUUGUACAGAAUCAUUGCA	2202	UGCAAUGAUUCUGUACAAUCAUC	2203	NM_001198823.1_3270-3292_as
AD-738054.1	GCUUCACUACCCAUCGGUGUA	2204	UACACCGAUGGGUAGUGAAGCAA	2205	NM_001198823.1_2512-2534_as
AD-738055.1	UUUUAUGUGCACACAUUAGGA	2206	UCCUAAUGUGUGCACAUAAAACA	2207	NM_001198823.1_3080-3102_G1A_as
AD-738056.1	CGCUUUCUACACUGUAUUACA	2208	UGUAAUACAGUGUAGAAAGCGAU	2209	XM_005548887.2_3401-3423_as
AD-738057.1	GCUUUCUACACUGUAUUACAA	2210	UUGUAATACAGUGUAGAAAGCGA	2211	XM_005548887.2_3402-3424_as
AD-738058.1	UUCUACACUGUAUUACAUAAA	2212	UUUAUGTAAUACAGUGUAGAAAG	2213	XM_005548887.2_3405-3427_as
AD-738059.1	UUUCUACACUGUAUUACAUAA	2214	UUAUGUAAUACAGUGUAGAAAGC	2215	XM_005548887.2_3404-3426_as
AD-738060.1	AUUUAGCUGUAUCAAACUAGA	2216	UCUAGUTUGAUACAGCUAAAUUC	2217	XM_005548887.2_2837-2859_as
AD-738061.1	UUCCUGAUCACUAUGCAUUUA	2218	UAAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAG	2219	XM_005548887.2_3030-3052_as
AD-738062.1	GUGCUGUAACACAAGUAGAUA	2220	UAUCUACUUGUGUUACAGCACAG	2221	XM_005548887.2_2716-2738_as
AD-738063.1	UUUAGCUGUAUCAAACUAGUA	2222	UACUAGTUUGAUACAGCUAAAUU	2223	XM_005548887.2_2838-2860_as
AD-738064.1	UUUCCUGAUCACUAUGCAUUA	2224	UAAUGCAUAGUGAUCAGGAAAGG	2225	XM_005548887.2_3029-3051_as
AD-738065.1	AAUGGGUUUUGUGUACUGUAA	2226	UUACAGTACACAAAACCCAUUAA	2227	XM_005548887.2_2813-2835_as
AD-738066.1	UUACUGUACAGAUUGCUGCUA	2228	UAGCAGCAAUCUGUACAGUAAAA	2229	XM_005548887.2_3113-3135_as

AD-738067.1	AUUGUACAGAAUCAUUGCUUA	2230	UAAGCAAUGAUUCUGUACAAUCA	2231	XM_005548887.2_3371-3393_as
AD-738068.1	UUGUACAGAAUCAUUGCUUAA	2232	UUAAGCAAUGAUUCUGUACAAUC	2233	XM_005548887.2_3372-3394_as
AD-738069.1	AUAUGCUGAAGAAGUACGUCA	2234	UGACGUACUUCUUCAGCAUAUUG	2235	XM_005548887.2_1740-1762_as
AD-738070.1	ACCAUUGCUUCACUACCCAUA	2236	UAUGGGTAGUGAAGCAAUGGUUU	2237	XM_005548887.2_2616-2638_as
AD-738071.1	CUGUGCUGUAACACAAGUAGA	2238	UCUACUTGUGUUACAGCACAGCU	2239	XM_005548887.2_2714-2736_as
AD-738072.1	UGCUGUAACACAAGUAGAUGA	2240	UCAUCUACUUGUGUUACAGCACA	2241	XM_005548887.2_2717-2739_as
AD-738073.1	ACAGCUGUGCUGUAACACAAA	2242	UUUGUGTUACAGCACAGCUGUCA	2243	XM_005548887.2_2710-2732_as
AD-738074.1	GCUGUAACACAAGUAGAUGCA	2244	UGCAUCTACUUGUGUUACAGCAC	2245	XM_005548887.2_2718-2740_as
AD-738075.1	UCAAACUAGUGCAUGAAUAGA	2246	UCUAUUCAUGCACUAGUUUGAUA	2247	XM_005548887.2_2848-2870_as
AD-738076.1	CAAACUAGUGCAUGAAUAGAA	2248	UUCUAUTCAUGCACUAGUUUGAU	2249	XM_005548887.2_2849-2871_as
AD-738077.1	UGCAGGAUGAUUGUACAGAAA	2250	UUUCUGTACAAUCAUCCUGCAGA	2251	XM_005548887.2_3362-3384_as
AD-738078.1	GCAGGAUGAUUGUACAGAAUA	2252	UAUUCUGUACAAUCAUCCUGCAG	2253	XM_005548887.2_3363-3385_as
AD-738079.1	CAGGAUGAUUGUACAGAAUCA	2254	UGAUUCTGUACAAUCAUCCUGCA	2255	XM_005548887.2_3364-3386_as
AD-738080.1	UAUCAAACUAGUGCAUGAAUA	2256	UAUUCATGCACUAGUUUGAUACA	2257	XM_005548887.2_2846-2868_as
AD-738081.1	UUUGUGCCUGUUUUAUGUGCA	2258	UGCACATAAAACAGGCACAAAGA	2259	XM_005548887.2_3180-3202_as
AD-738082.1	UUGUGCCUGUUUUAUGUGCAA	2260	UUGCACAUAAAACAGGCACAAAG	2261	XM_005548887.2_3181-3203_as
AD-738083.1	CUGCAGGAUGAUUGUACAGAA	2262	UUCUGUACAAUCAUCCUGCAGAA	2263	XM_005548887.2_3361-3383_as

AD-738084.1	CAGGUCAUGAGAGAAUGGGAA	2264	UUCCCATUCUCUCAUGACCUGGG	2265	XM_005548887.2_1487-1509_as
AD-738085.1	UAUGCUGAAGAAGUACGUCCA	2266	UGGACGTACUUCUUCAGCAUAUU	2267	XM_005548887.2_1741-1763_as
AD-738086.1	AUGCUGAAGAAGUACGUCCGA	2268	UCGGACGUACUUCUUCAGCAUAU	2269	XM_005548887.2_1742-1764_as
AD-738087.1	AAACCAUUGCUUCACUACCCA	2270	UGGGUAGUGAAGCAAUGGUUUUG	2271	XM_005548887.2_2614-2636_as
AD-738088.1	AACCAUUGCUUCACUACCCAA	2272	UUGGGUAGUGAAGCAAUGGUUUU	2273	XM_005548887.2_2615-2637_as
AD-738089.1	UAUGUGCACACAUUAGGCAUA	2274	UAUGCCTAAUGUGUGCACAUAAA	2275	XM_005548887.2_3193-3215_as
AD-738090.1	UGUGCACACAUUAGGCAUUGA	2276	UCAAUGCCUAAUGUGUGCACAUA	2277	XM_005548887.2_3195-3217_as
AD-738091.1	GGAUGAUUGUACAGAAUCAUA	2278	UAUGAUTCUGUACAAUCAUCCUG	2279	XM_005548887.2_3366-3388_as
AD-738092.1	ACCAUCCAGAACUGGUGCAAA	2280	UUUGCACCAGUUCUGGAUGGUCA	2281	XM_005548887.2_767-789_as
AD-738093.1	CACCGAGAGAGAAUGUCCCAA	2282	UUGGGACAUUCUCUCUCGGUGCU	2283	XM_005548887.2_1469-1491_as
AD-738094.1	GUUGUAUAUUAUUCUUGUGGA	2284	UCCACAAGAAUAAUAUACAACUG	2285	XM_005548887.2_2906-2928_as
AD-738095.1	UUAUGUGCACACAUUAGGCAA	2286	UUGCCUAAUGUGUGCACAUAAAA	2287	XM_005548887.2_3192-3214_as
AD-738096.1	AUGUGCACACAUUAGGCAUUA	2288	UAAUGCCUAAUGUGUGCACAUAA	2289	XM_005548887.2_3194-3216_as
AD-738097.1	GUGCACACAUUAGGCAUUGAA	2290	UUCAAUGCCUAAUGUGUGCACAU	2291	XM_005548887.2_3196-3218_as
AD-738098.1	UGAUUGUACAGAAUCAUUGCA	2292	UGCAAUGAUUCUGUACAAUCAUC	2293	XM_005548887.2_3369-3391_as
AD-738099.1	GCUUCACUACCCAUCGGUGUA	2294	UACACCGAUGGGUAGUGAAGCAA	2295	XM_005548887.2_2622-2644_as
AD-738100.1	UUUUAUGUGCACACAUUAGGA	2296	UCCUAATGUGUGCACAUAAAACA	2297	XM_005548887.2_3190-3212_as

Таблица 14. Дополнительные модифицированные последовательности APP человека

Мишень	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO
APP	AD-886823.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2298	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2299
APP	AD-886824.1	usasgug(Chd)AfugAfAfuagauucucaL96	2300	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2301
APP	AD-886825.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2302	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2303
APP	AD-886826.1	usasgug(Chd)AfudGadAuagauucucaL96	2304	VPusGfsagaa(Tgn)cuauUfcAfuGfcacuasgsu	2305
APP	AD-886827.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2306	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2307
APP	AD-886828.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2308	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfugcacuasgsu	2309
APP	AD-886829.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2310	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2311
APP	AD-886830.1	usasgug(Chd)AfuGfaAfuagauucucaL96	2312	VPusGfsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2313
APP	AD-886831.1	usasgug(Chd)AfuGfaAfuagauucucaL96	2314	VPusGfsagaa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2315
APP	AD-886832.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2316	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2317
APP	AD-886833.1	usasgug(Chd)AfuGfaAfuagauucucaL96	2318	VPusdGsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2319
APP	AD-886834.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2320	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2321
APP	AD-886836.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2322	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2323
APP	AD-886837.1	usasgug(Chd)AfudGaAfuagauucucaL96	2324	VPusGfsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2325
APP	AD-886838.1	usasgug(Chd)AfudGaAfuagauucucaL96	2326	VPusGfsagaa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2327

APP	AD-886839.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2328	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2329
APP	AD-886839.2	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2330	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2331
APP	AD-886840.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2332	VPusdGsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2333
APP	AD-886841.1	usasgug(Chd)AfudGaAfuagauucucaL96	2334	VPusdGsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2335
APP	AD-886842.1	usasgug(Chd)AfudGadAuagauucucaL96	2336	VPusdGsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2337
APP	AD-886843.1	usasgug(Chd)audGadAuagauucucaL96	2338	VPusdGsagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2339
APP	AD-886844.1	usasgug(Chd)audGadAuagauucucaL96	2340	VPudGagaa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2341
APP	AD-886845.1	usasgug(Chd)audGadAuagauucucaL96	2342	VPudGagaa(Tgn)cuauUfcAfudGcacuasgsu	2343
APP	AD-886846.1	usasgug(Chd)audGadAuagauucucaL96	2344	VPudGadGadAucuauUfcAfudGcacuasgsu	2345
APP	AD-886847.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2346	VPudGagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2347
APP	AD-886848.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2348	VPusdGsagadA(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2349
APP	AD-886849.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2350	VPusdGsagdAa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2351
APP	AD-886850.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2352	VPusdGsagadA(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2353
APP	AD-886851.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2354	VPusdGsagdAa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2355
APP	AD-886852.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2356	VPusdGsagadA(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2357
APP	AD-886853.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2358	VPusdGsagdAa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2359
APP	AD-886854.1	usasgug(Chd)AfudGadAuagauucucaL96	2360	VPusdGsagdAa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2361

APP	AD-886855.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2362	VPudGagadA(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2363
APP	AD-886856.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2364	VPudGagdAa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2365
APP	AD-886857.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2366	VPudGagadA(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2367
APP	AD-886858.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2368	VPudGagdAa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2369
APP	AD-886859.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2370	VPudGagadA(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2371
APP	AD-886860.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2372	VPudGagdAa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2373
APP	AD-886861.1	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2374	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasusg	2375
APP	AD-886862.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2376	VPusdGsagadA(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasusg	2377
APP	AD-886863.1	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2378	VPusdGsagdAa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasusg	2379
APP	AD-886864.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2380	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	2381
APP	AD-886865.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2382	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	2383
APP	AD-886866.1	gsgscua(Chd)dGaAfAfAfuccaaccuaaL96	2384	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	2385
APP	AD-886867.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2386	VPuUfaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	2387
APP	AD-886868.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2388	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcguagccsgsu	2389
APP	AD-886869.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2390	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2391
APP	AD-886870.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2392	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2393
APP	AD-886871.1	gsgscua(Chd)gaAfaAfuccaaccuaaL96	2394	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2395

APP	AD-886872.1	gsgscua(Chd)gaAfaAfuccaaccuaaL96	2396	VPusUfsaggu(Tgn)ggauUfuUfcdGuagccsgsu	2397
APP	AD-886873.1	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccuaaL96	2398	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2399
APP	AD-886874.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2400	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2401
APP	AD-886875.1	gsgscua(Chd)gaAfaAfuccaaccuaaL96	2402	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2403
APP	AD-886876.1	gsgscua(Chd)gaAfaAfuccaaccuaaL96	2404	VPusUfsaggu(Tgn)ggauUfuUfcguagccsgsu	2405
APP	AD-886877.1	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccuaaL96	2406	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2407
APP	AD-886878.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2408	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcguagccsgsu	2409
APP	AD-886879.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2410	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2411
APP	AD-886880.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2412	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2413
APP	AD-886881.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2414	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2415
APP	AD-886882.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2416	VPuUfaggdT(Tgn)ggauuuUfcguagccsgsu	2417
APP	AD-886883.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2418	VPuUfaggdT(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2419
APP	AD-886884.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2420	VPuUfaggdT(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2421
APP	AD-886885.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2422	VPuUfaggdT(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2423
APP	AD-886886.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2424	VPuUfagdGu(Tgn)ggauuuUfcguagccsgsu	2425
APP	AD-886887.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2426	VPuUfagdGu(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2427
APP	AD-886888.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2428	VPuUfagdGu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2429

APP	AD-886889.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2430	VPuUfagdGu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2431
APP	AD-886890.1	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2432	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsusg	2433
APP	AD-886891.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2434	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsusg	2435
APP	AD-886892.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2436	VPuUfaggdT(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsusg	2437
APP	AD-886893.1	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2438	VPuUfagdGu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsusg	2439
APP	AD-886894.1	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2440	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2441
APP	AD-886895.1	asasag(Ahd)gCfaAfAfAfcuauucagaaL96	2442	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2443
APP	AD-886896.1	asasagag(Chd)aAfAfAfcuauucagaaL96	2444	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2445
APP	AD-886897.1	asasagagCfaAfAfAfcua(Uhd)ucagaaL96	2446	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2447
APP	AD-886898.1	asasagagCfaAfAfAfcuau(Uhd)cagaaL96	2448	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2449
APP	AD-886899.1	asasagagCfaAfAfAfcuauu(Chd)agaaL96	2450	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2451
APP	AD-886900.1	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2452	VPusUfscugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2453
APP	AD-886901.1	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2454	VPuUfcugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2455
APP	AD-886902.1	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2456	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2457
APP	AD-886903.1	asasag(Ahd)gCfaAfAfAfcuauucagaaL96	2458	VPuUfcugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2459
APP	AD-886904.1	asasag(Ahd)gCfaAfAfAfcuauucagaaL96	2460	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2461
APP	AD-886905.1	asasagag(Chd)aAfAfAfcuauucagaaL96	2462	VPuUfcugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2463

APP	AD-886906.1	asasagag(Chd)aAfAfAfcuauucagaaL96	2464	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2465
APP	AD-886907.1	asasagag(Chd)aAfaAfcuauucagaaL96	2466	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2467
APP	AD-886908.1	asasagag(Chd)adAadAcuauucagaaL96	2468	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2469
APP	AD-886909.1	asasagag(Chd)adAadAcuauucagaaL96	2470	VPuUfcugdAauagudTuUfgdCucuuuscsu	2471
APP	AD-886910.1	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2472	VPusUfscugAfauaguuuUfgCfucuuususg	2473
APP	AD-886911.1	asasagagCfaAfAfAfcua(Uhd)ucagaaL96	2474	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuususg	2475
APP	AD-886912.1	asasagag(Chd)aAfAfAfcuauucagaaL96	2476	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuususg	2477
APP	AD-886913.1	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2478	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2479
APP	AD-886914.1	ususua(Uhd)gAfuUfUfAfcucauuaucaL96	2480	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2481
APP	AD-886915.1	ususuaug(Ahd)uUfUfAfcucauuaucaL96	2482	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2483
APP	AD-886916.1	ususuaugAfuUfUfAfcuc(Ahd)uuaucaL96	2484	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2485
APP	AD-886917.1	ususuaugAfuUfUfAfcuca(Uhd)uaucaL96	2486	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2487
APP	AD-886918.1	ususuaugAfuUfUfAfcucau(Uhd)aucaL96	2488	VPusGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2489
APP	AD-886919.1	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2490	VPusGfsauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2491
APP	AD-886920.1	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2492	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2493
APP	AD-886921.1	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2494	VPudGauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2495
APP	AD-886922.1	ususua(Uhd)gAfuUfUfAfcucauuaucaL96	2496	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2497

APP	AD-886923.1	ususua(Uhd)gAfuUfUfAfcucauuaucaL96	2498	VPudGauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2499
APP	AD-886924.1	ususuaug(Ahd)uUfUfAfcucauuaucaL96	2500	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2501
APP	AD-886925.1	ususuaug(Ahd)uUfUfAfcucauuaucaL96	2502	VPudGauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2503
APP	AD-886926.1	ususuaug(Ahd)uUfuAfcucauuaucaL96	2504	VPudGauadAugagudAaAfuCfauaaasasc	2505
APP	AD-886927.1	ususuaug(Ahd)uUfudAcucauuaucaL96	2506	VPudGauadAugagudAaAfuCfauaaasasc	2507
APP	AD-886928.1	ususuaug(Ahd)uUfudAcucauuaucaL96	2508	VPudGauadAugagudAaAfudCauaaasasc	2509
APP	AD-886929.1	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2510	VPusGfsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2511
APP	AD-886930.1	ususuaugAfuUfUfAfcuc(Ahd)uuaucaL96	2512	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2513
APP	AD-886931.1	ususuaug(Ahd)uUfUfAfcucauuaucaL96	2514	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2515

Пояснения к таблице 14: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2м-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2м-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Таблица 15. Дополнительные немодифицированные последовательности APP

Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO
AD-886823.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2516	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2517
AD-886824.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2518	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2519

AD-886825.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2520	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2521
AD-886826.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2522	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2523
AD-886827.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2524	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2525
AD-886828.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2526	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2527
AD-886829.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2528	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2529
AD-886830.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2530	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2531
AD-886831.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2532	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2533
AD-886832.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2534	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2535
AD-886833.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2536	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2537
AD-886834.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2538	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2539
AD-886836.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2540	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2541
AD-886837.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2542	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2543
AD-886838.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2544	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2545
AD-886839.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2546	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2547
AD-886839.2	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2548	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2549
AD-886840.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2550	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2551
AD-886841.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2552	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2553

AD-886842.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2554	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2555
AD-886843.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2556	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2557
AD-886844.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2558	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2559
AD-886845.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2560	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2561
AD-886846.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2562	UGAGAAUCUAUUCAUGCACUAGU	2563
AD-886847.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2564	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2565
AD-886848.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2566	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2567
AD-886849.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2568	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2569
AD-886850.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2570	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2571
AD-886851.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2572	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2573
AD-886852.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2574	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2575
AD-886853.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2576	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2577
AD-886854.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2578	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2579
AD-886855.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2580	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2581
AD-886856.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2582	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2583
AD-886857.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2584	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2585
AD-886858.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2586	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2587

AD-886859.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2588	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2589
AD-886860.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2590	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2591
AD-886861.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2592	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAUG	2593
AD-886862.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2594	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAUG	2595
AD-886863.1	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2596	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAUG	2597
AD-886864.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2598	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2599
AD-886865.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2600	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2601
AD-886866.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2602	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2603
AD-886867.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2604	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2605
AD-886868.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2606	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2607
AD-886869.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2608	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2609
AD-886870.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2610	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2611
AD-886871.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2612	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2613
AD-886872.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2614	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2615
AD-886873.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2616	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2617
AD-886874.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2618	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2619
AD-886875.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2620	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2621

AD-886876.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2622	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2623
AD-886877.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2624	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2625
AD-886878.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2626	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2627
AD-886879.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2628	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2629
AD-886880.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2630	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2631
AD-886881.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2632	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2633
AD-886882.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2634	UUAGGTTGGAUUUUCGUAGCCGU	2635
AD-886883.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2636	UUAGGTTGGAUUUUCGUAGCCGU	2637
AD-886884.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2638	UUAGGTTGGAUTUUCGUAGCCGU	2639
AD-886885.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2640	UUAGGTTGGAUTUUCGUAGCCGU	2641
AD-886886.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2642	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2643
AD-886887.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2644	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2645
AD-886888.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2646	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2647
AD-886889.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2648	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2649
AD-886890.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2650	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCUG	2651
AD-886891.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2652	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCUG	2653
AD-886892.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2654	UUAGGTTGGAUTUUCGUAGCCUG	2655

AD-886893.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2656	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCUG	2657
AD-886894.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2658	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2659
AD-886895.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2660	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2661
AD-886896.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2662	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2663
AD-886897.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2664	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2665
AD-886898.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2666	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2667
AD-886899.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2668	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2669
AD-886900.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2670	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2671
AD-886901.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2672	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2673
AD-886902.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2674	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2675
AD-886903.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2676	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2677
AD-886904.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2678	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2679
AD-886905.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2680	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2681
AD-886906.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2682	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2683
AD-886907.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2684	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2685
AD-886908.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2686	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2687
AD-886909.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2688	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2689

AD-886910.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2690	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUUG	2691
AD-886911.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2692	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUUG	2693
AD-886912.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2694	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUUG	2695
AD-886913.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2696	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2697
AD-886914.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2698	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2699
AD-886915.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2700	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2701
AD-886916.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2702	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2703
AD-886917.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2704	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2705
AD-886918.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2706	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2707
AD-886919.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2708	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2709
AD-886920.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2710	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2711
AD-886921.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2712	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2713
AD-886922.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2714	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2715
AD-886923.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2716	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2717
AD-886924.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2718	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2719
AD-886925.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2720	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2721
AD-886926.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2722	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2723

AD-886927.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2724	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2725
AD-886928.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2726	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2727
AD-886929.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2728	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2729
AD-886930.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2730	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2731
AD-886931.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2732	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2733

Таблица 16A. Дополнительные модифицированные смысловые последовательности и целевые последовательности APP человека

Название дуплекса	**Мишень**	**Смысловая последовательность (5′-3′)**	**SEQ ID NO**	**Целевая последовательность мРНК**	**SEQ ID NO**
AD-961583	APP	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccusasa	2734	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2735
AD-961584	APP	asasagag(Chd)aAfaAfcuauucagsasa	2736	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2737
AD-961585	APP	asasagag(Chd)adAadAcuauucagsasa	2738	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2739
AD-961586	APP	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuauscsa	2740	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2741

Пояснения к таблице 16A: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Таблица 16B. Дополнительные модифицированные антисмысловые последовательности и целевые последовательности APP человека

Название дуплекса	Мишень	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO
AD-961583	APP	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2742	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2743
AD-961584	APP	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2744	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2745
AD-961585	APP	VPuUfcugdAauagudTuUfgdCucuuuscsu	2746	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2747
AD-961586	APP	VPusGfsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2748	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2749

Пояснения к таблице 16B: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

В таблице 17 обобщены результаты скрининга воздействия на APP в клетках Be(2), проводимого с использованием нескольких доз при концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК относительно ненацеливающегося контроля AD-1955

Таблица 17. Скрининговое исследование воздействия на APP в линиях клеток Be(2)C с использованием нескольких доз при концентрации 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ

Дуплекс	Среднее количество оставшейся мРНК (%)	Стандартное отклонение	Доза	Единица измерения дозы
AD-738012.1	12,47	3,92	10	нМ
AD-738013.1	8,78	1,74	10	нМ
AD-738014.1	10,27	3,95	10	нМ
AD-738015.1	9,84	3,00	10	нМ
AD-738016.1	11,79	4,10	10	нМ
AD-738017.1	12,85	2,41	10	нМ
AD-738018.1	13,22	2,40	10	нМ
AD-738019.1	14,57	2,64	10	нМ
AD-738020.1	9,06	2,84	10	нМ
AD-738021.1	12,95	6,42	10	нМ
AD-738022.1	10,55	1,29	10	нМ
AD-738023.1	8,22	1,41	10	нМ
AD-738024.1	13,51	4,75	10	нМ
AD-738025.1	48,96	7,46	10	нМ
AD-738026.1	11,78	2,88	10	нМ
AD-738027.1	10,71	2,22	10	нМ
AD-738028.1	18,52	2,12	10	нМ
AD-738029.1	17,74	4,49	10	нМ
AD-738030.1	25,60	5,77	10	нМ
AD-738031.1	28,70	6,14	10	нМ
AD-738032.1	13,38	9,34	10	нМ
AD-738033.1	10,13	1,96	10	нМ
AD-738034.1	15,22	6,91	10	нМ
AD-738035.1	14,59	5,75	10	нМ
AD-738036.1	19,64	12,56	10	нМ

AD-738037.1	21,74	10,22	10	нМ
AD-738038.1	27,23	3,73	10	нМ
AD-738039.1	28,08	5,99	10	нМ
AD-738040.1	60,35	0,96	10	нМ
AD-738041.1	38,29	15,92	10	нМ
AD-738042.1	25,54	7,15	10	нМ
AD-738043.1	12,59	4,84	10	нМ
AD-738044.1	44,57	13,69	10	нМ
AD-738045.1	218,56	104,83	10	нМ
AD-738046.1	263,77	29,64	10	нМ
AD-738047.1	35,84	3,46	10	нМ
AD-738048.1	34,43	4,01	10	нМ
AD-397217.2	70,05	6,00	10	нМ
AD-738049.1	13,20	6,16	10	нМ
AD-738050.1	11,02	0,82	10	нМ
AD-738051.1	40,85	6,01	10	нМ
AD-738052.1	37,45	14,43	10	нМ
AD-738053.1	30,69	7,50	10	нМ
AD-738054.1	62,81	13,33	10	нМ
AD-738055.1	28,18	9,27	10	нМ
AD-738056.1	28,91	4,29	10	нМ
AD-738057.1	24,47	7,91	10	нМ
AD-738058.1	49,05	8,41	10	нМ
AD-738059.1	35,32	9,27	10	нМ
AD-738060.1	25,40	3,87	10	нМ
AD-738061.1	53,19	2,95	10	нМ
AD-738062.1	17,28	7,65	10	нМ
AD-738063.1	33,40	9,94	10	нМ
AD-738064.1	30,75	4,43	10	нМ
AD-738065.1	28,34	14,64	10	нМ
AD-738066.1	92,51	16,17	10	нМ
AD-738067.1	30,74	7,71	10	нМ
AD-738068.1	25,12	2,84	10	нМ
AD-738069.1	59,72	9,34	10	нМ

AD-738070.1	35,03	9,43	10	нМ
AD-738071.1	15,79	2,79	10	нМ
AD-738072.1	63,54	33,06	10	нМ
AD-738073.1	28,05	3,62	10	нМ
AD-738074.1	31,74	5,88	10	нМ
AD-738075.1	174,04	56,95	10	нМ
AD-738076.1	29,35	8,89	10	нМ
AD-738077.1	14,69	5,00	10	нМ
AD-738078.1	15,15	2,61	10	нМ
AD-738079.1	11,40	3,42	10	нМ
AD-738080.1	10,80	0,91	10	нМ
AD-738081.1	36,37	8,31	10	нМ
AD-738082.1	28,65	4,80	10	нМ
AD-738083.1	9,98	0,75	10	нМ
AD-738084.1	31,76	4,26	10	нМ
AD-738085.1	48,74	6,11	10	нМ
AD-738086.1	60,41	10,30	10	нМ
AD-738087.1	12,21	2,15	10	нМ
AD-738088.1	44,49	10,16	10	нМ
AD-738089.1	31,43	4,82	10	нМ
AD-738090.1	23,34	5,54	10	нМ
AD-738091.1	35,28	12,92	10	нМ
AD-738092.1	89,59	18,72	10	нМ
AD-738093.1	71,33	16,07	10	нМ
AD-738094.1	18,69	3,23	10	нМ
AD-738095.1	30,93	6,90	10	нМ
AD-738096.1	26,70	5,20	10	нМ
AD-738097.1	65,74	9,99	10	нМ
AD-738098.1	16,18	4,17	10	нМ
AD-738099.1	48,95	9,69	10	нМ
AD-738100.1	67,26	11,31	10	нМ
AD-738012.1	17,40	2,53	1	нМ
AD-738013.1	15,51	2,70	1	нМ
AD-738014.1	23,54	9,95	1	нМ

AD-738015.1	21,35	2,38	1	нМ
AD-738016.1	20,20	1,90	1	нМ
AD-738017.1	15,67	2,60	1	нМ
AD-738018.1	17,00	0,80	1	нМ
AD-738019.1	17,58	7,97	1	нМ
AD-738020.1	15,47	3,64	1	нМ
AD-738021.1	14,81	4,24	1	нМ
AD-738022.1	13,71	2,86	1	нМ
AD-738023.1	17,33	4,91	1	нМ
AD-738024.1	20,64	7,04	1	нМ
AD-738025.1	95,81	28,98	1	нМ
AD-738026.1	28,29	10,28	1	нМ
AD-738027.1	15,94	3,44	1	нМ
AD-738028.1	25,76	10,62	1	нМ
AD-738029.1	18,83	6,50	1	нМ
AD-738030.1	30,24	7,29	1	нМ
AD-738031.1	30,77	6,54	1	нМ
AD-738032.1	25,98	6,57	1	нМ
AD-738033.1	31,28	8,14	1	нМ
AD-738034.1	25,06	6,27	1	нМ
AD-738035.1	21,67	1,11	1	нМ
AD-738036.1	32,29	11,81	1	нМ
AD-738037.1	30,77	5,48	1	нМ
AD-738038.1	19,03	1,00	1	нМ
AD-738039.1	20,25	5,55	1	нМ
AD-738040.1	51,87	7,09	1	нМ
AD-738041.1	35,67	8,23	1	нМ
AD-738042.1	33,70	9,34	1	нМ
AD-738043.1	19,76	3,35	1	нМ
AD-738044.1	43,40	9,46	1	нМ
AD-738045.1	97,99	13,43	1	нМ
AD-738046.1	112,65	25,09	1	нМ
AD-738047.1	37,50	4,18	1	нМ
AD-738048.1	23,67	0,94	1	нМ

AD-397217.2	60,11	7,67	1	нМ
AD-738049.1	20,00	1,41	1	нМ
AD-738050.1	36,49	7,06	1	нМ
AD-738051.1	27,03	6,08	1	нМ
AD-738052.1	31,82	7,17	1	нМ
AD-738053.1	14,96	2,91	1	нМ
AD-738054.1	32,00	5,62	1	нМ
AD-738055.1	27,57	7,73	1	нМ
AD-738056.1	15,16	0,70	1	нМ
AD-738057.1	14,83	3,32	1	нМ
AD-738058.1	33,09	9,91	1	нМ
AD-738059.1	26,76	5,77	1	нМ
AD-738060.1	11,79	2,64	1	нМ
AD-738061.1	28,49	1,35	1	нМ
AD-738062.1	15,89	6,49	1	нМ
AD-738063.1	25,01	8,31	1	нМ
AD-738064.1	16,91	2,56	1	нМ
AD-738065.1	15,45	2,85	1	нМ
AD-738066.1	51,85	8,48	1	нМ
AD-738067.1	20,90	4,96	1	нМ
AD-738068.1	15,82	2,70	1	нМ
AD-738069.1	81,26	2,84	1	нМ
AD-738070.1	59,48	11,42	1	нМ
AD-738071.1	15,12	3,89	1	нМ
AD-738072.1	40,16	7,78	1	нМ
AD-738073.1	18,46	5,20	1	нМ
AD-738074.1	27,74	1,97	1	нМ
AD-738075.1	83,53	9,94	1	нМ
AD-738076.1	50,62	3,51	1	нМ
AD-738077.1	21,52	4,49	1	нМ
AD-738078.1	24,49	10,05	1	нМ
AD-738079.1	8,66	2,69	1	нМ
AD-738080.1	28,88	1,12	1	нМ
AD-738081.1	77,35	10,22	1	нМ

AD-738082.1	48,10	10,63	1	нМ
AD-738083.1	23,74	4,60	1	нМ
AD-738084.1	100,84	2,83	1	нМ
AD-738085.1	101,30	4,73	1	нМ
AD-738086.1	60,29	24,33	1	нМ
AD-738087.1	9,71	3,71	1	нМ
AD-738088.1	79,16	7,79	1	нМ
AD-738089.1	35,37	8,78	1	нМ
AD-738090.1	37,16	13,37	1	нМ
AD-738091.1	49,56	10,83	1	нМ
AD-738092.1	79,50	10,15	1	нМ
AD-738093.1	96,42	16,26	1	нМ
AD-738094.1	41,63	5,90	1	нМ
AD-738095.1	45,03	8,10	1	нМ
AD-738096.1	44,52	11,55	1	нМ
AD-738097.1	78,88	13,42	1	нМ
AD-738098.1	28,84	8,43	1	нМ
AD-738099.1	68,10	16,73	1	нМ
AD-738100.1	84,53	5,73	1	нМ
AD-738012.1	35,64	12,05	0,1	нМ
AD-738013.1	29,76	5,05	0,1	нМ
AD-738014.1	47,17	13,55	0,1	нМ
AD-738015.1	35,51	13,38	0,1	нМ
AD-738016.1	38,17	9,76	0,1	нМ
AD-738017.1	30,03	7,04	0,1	нМ
AD-738018.1	20,38	4,76	0,1	нМ
AD-738019.1	30,10	4,89	0,1	нМ
AD-738020.1	44,67	8,48	0,1	нМ
AD-738021.1	30,05	5,88	0,1	нМ
AD-738022.1	30,24	5,96	0,1	нМ
AD-738023.1	25,74	7,75	0,1	нМ
AD-738024.1	31,43	10,51	0,1	нМ
AD-738025.1	112,57	14,24	0,1	нМ
AD-738026.1	54,28	6,70	0,1	нМ

AD-738027.1	26,02	4,95	0,1	нМ
AD-738028.1	35,82	10,41	0,1	нМ
AD-738029.1	40,29	3,76	0,1	нМ
AD-738030.1	51,38	24,04	0,1	нМ
AD-738031.1	40,78	11,79	0,1	нМ
AD-738032.1	47,97	6,74	0,1	нМ
AD-738033.1	38,57	7,04	0,1	нМ
AD-738034.1	46,53	13,21	0,1	нМ
AD-738035.1	43,04	12,39	0,1	нМ
AD-738036.1	43,08	3,41	0,1	нМ
AD-738037.1	87,09	39,32	0,1	нМ
AD-738038.1	64,97	3,06	0,1	нМ
AD-738039.1	74,15	30,96	0,1	нМ
AD-738040.1	159,41	39,34	0,1	нМ
AD-738041.1	108,29	36,98	0,1	нМ
AD-738042.1	69,15	28,46	0,1	нМ
AD-738043.1	45,00	17,66	0,1	нМ
AD-738044.1	88,04	17,84	0,1	нМ
AD-738045.1	238,11	15,24	0,1	нМ
AD-738046.1	259,68	3,44	0,1	нМ
AD-738047.1	136,91	44,65	0,1	нМ
AD-738048.1	131,72	13,39	0,1	нМ
AD-397217.2	222,75	51,71	0,1	нМ
AD-738049.1	65,58	6,12	0,1	нМ
AD-738050.1	63,97	11,64	0,1	нМ
AD-738051.1	89,72	27,54	0,1	нМ
AD-738052.1	140,07	36,18	0,1	нМ
AD-738053.1	77,09	14,75	0,1	нМ
AD-738054.1	205,91	46,37	0,1	нМ
AD-738055.1	197,02	44,70	0,1	нМ
AD-738056.1	85,09	14,19	0,1	нМ
AD-738057.1	87,72	18,23	0,1	нМ
AD-738058.1	164,40	24,71	0,1	нМ
AD-738059.1	129,01	9,61	0,1	нМ

AD-738060.1	63,48	35,21	0,1	нМ
AD-738061.1	191,48	13,85	0,1	нМ
AD-738062.1	108,14	8,70	0,1	нМ
AD-738063.1	100,27	16,53	0,1	нМ
AD-738064.1	46,78	12,88	0,1	нМ
AD-738065.1	84,72	11,97	0,1	нМ
AD-738066.1	218,00	48,39	0,1	нМ
AD-738067.1	123,65	34,39	0,1	нМ
AD-738068.1	90,93	17,12	0,1	нМ
AD-738069.1	300,08	12,73	0,1	нМ
AD-738070.1	238,24	7,61	0,1	нМ
AD-738071.1	46,50	1,25	0,1	нМ
AD-738072.1	58,01	21,95	0,1	нМ
AD-738073.1	68,05	19,98	0,1	нМ
AD-738074.1	134,77	30,73	0,1	нМ
AD-738075.1	328,84	50,48	0,1	нМ
AD-738076.1	237,89	30,07	0,1	нМ
AD-738077.1	108,45	14,70	0,1	нМ
AD-738078.1	127,49	44,03	0,1	нМ
AD-738079.1	46,06	9,44	0,1	нМ
AD-738080.1	57,45	19,09	0,1	нМ
AD-738081.1	147,89	27,56	0,1	нМ
AD-738082.1	169,52	28,01	0,1	нМ
AD-738083.1	106,74	6,93	0,1	нМ
AD-738084.1	242,62	60,78	0,1	нМ
AD-738085.1	295,62	32,59	0,1	нМ
AD-738086.1	221,56	21,04	0,1	нМ
AD-738087.1	82,58	14,78	0,1	нМ
AD-738088.1	88,52	10,41	0,1	нМ
AD-738089.1	84,36	20,12	0,1	нМ
AD-738090.1	120,67	19,87	0,1	нМ
AD-738091.1	180,61	14,25	0,1	нМ
AD-738092.1	240,22	16,63	0,1	нМ
AD-738093.1	303,63	8,82	0,1	нМ

AD-738094.1	146,42	25,16	0,1	нМ
AD-738095.1	124,16	57,91	0,1	нМ
AD-738096.1	56,53	8,58	0,1	нМ
AD-738097.1	116,46	38,97	0,1	нМ
AD-738098.1	59,28	19,71	0,1	нМ
AD-738099.1	149,49	42,85	0,1	нМ
AD-738100.1	89,06	17,49	0,1	нМ

В таблице 18 обобщены результаты скрининга воздействия на APP в клетках Neuro2A, проводимого с использованием нескольких доз при концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК относительно ненацеливающегося контроля AD-1955

Таблица 18. Скрининговое исследование воздействия на APP в линиях клеток Neuro2A с использованием нескольких доз при концентрации 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ

Дуплекс	Среднее значение	Стандартное отклонение	Доза	Единица измерения дозы
AD-738012.1	0,11	0,07	10	нМ
AD-738013.1	0,20	0,06	10	нМ
AD-738014.1	1,12	0,42	10	нМ
AD-738015.1	1,72	1,20	10	нМ
AD-738016.1	0,98	0,31	10	нМ
AD-738017.1	0,32	0,24	10	нМ
AD-738018.1	0,14	0,07	10	нМ
AD-738019.1	0,63	0,25	10	нМ
AD-738020.1	0,11	0,08	10	нМ
AD-738021.1	1,20	0,52	10	нМ
AD-738022.1	1,86	0,95	10	нМ
AD-738023.1	1,18	0,53	10	нМ
AD-738024.1	3,13	1,81	10	нМ
AD-738025.1	11,77	3,21	10	нМ
AD-738026.1	0,81	0,44	10	нМ
AD-738027.1	0,23	0,10	10	нМ
AD-738028.1	0,15	0,15	10	нМ

AD-738029.1	1,48	0,93	10	нМ
AD-738030.1	1,45	0,99	10	нМ
AD-738031.1	2,72	0,68	10	нМ
AD-738032.1	3,04	0,84	10	нМ
AD-738033.1	2,71	0,98	10	нМ
AD-738034.1	4,98	3,47	10	нМ
AD-738035.1	1,51	0,77	10	нМ
AD-738036.1	1,18	1,21	10	нМ
AD-738037.1	2,87	1,38	10	нМ
AD-738038.1	1,52	0,43	10	нМ
AD-738039.1	5,43	2,42	10	нМ
AD-738040.1	12,15	3,03	10	нМ
AD-738041.1	4,14	2,38	10	нМ
AD-738042.1	4,41	2,78	10	нМ
AD-738043.1	0,67	0,51	10	нМ
AD-738044.1	1,21	0,74	10	нМ
AD-738045.1	21,32	2,05	10	нМ
AD-738046.1	8,41	3,63	10	нМ
AD-738047.1	1,92	1,96	10	нМ
AD-738048.1	0,83	0,24	10	нМ
AD-397217.2	14,29	4,68	10	нМ
AD-738049.1	4,40	2,05	10	нМ
AD-738050.1	1,46	0,17	10	нМ
AD-738051.1	1,48	1,43	10	нМ
AD-738052.1	4,60	0,68	10	нМ
AD-738053.1	3,92	1,90	10	нМ
AD-738054.1	6,95	1,84	10	нМ
AD-738055.1	2,82	0,53	10	нМ
AD-738056.1	4,83	3,07	10	нМ
AD-738057.1	4,79	3,01	10	нМ
AD-738058.1	12,43	4,84	10	нМ
AD-738059.1	5,66	1,40	10	нМ
AD-738060.1	4,24	0,94	10	нМ
AD-738061.1	10,85	2,10	10	нМ

AD-738062.1	1,34	0,51	10	нМ
AD-738063.1	31,40	6,43	10	нМ
AD-738064.1	0,77	0,71	10	нМ
AD-738065.1	6,43	1,80	10	нМ
AD-738066.1	30,73	12,64	10	нМ
AD-738067.1	3,79	0,76	10	нМ
AD-738068.1	4,60	1,19	10	нМ
AD-738069.1	36,14	12,51	10	нМ
AD-738070.1	34,99	13,86	10	нМ
AD-738071.1	1,84	1,71	10	нМ
AD-738072.1	1,29	1,22	10	нМ
AD-738073.1	0,65	0,14	10	нМ
AD-738074.1	1,28	0,51	10	нМ
AD-738075.1	75,00	22,72	10	нМ
AD-738076.1	19,31	2,56	10	нМ
AD-738077.1	5,21	1,66	10	нМ
AD-738078.1	7,24	5,26	10	нМ
AD-738079.1	1,64	0,72	10	нМ
AD-738080.1	2,17	1,31	10	нМ
AD-738081.1	13,03	2,64	10	нМ
AD-738082.1	3,37	1,05	10	нМ
AD-738083.1	5,36	2,87	10	нМ
AD-738084.1	22,04	7,85	10	нМ
AD-738085.1	6,81	1,80	10	нМ
AD-738086.1	35,05	12,18	10	нМ
AD-738087.1	0,14	0,10	10	нМ
AD-738088.1	34,43	18,92	10	нМ
AD-738089.1	11,16	1,48	10	нМ
AD-738090.1	4,55	0,77	10	нМ
AD-738091.1	9,04	2,02	10	нМ
AD-738092.1	48,12	5,51	10	нМ
AD-738093.1	47,41	11,32	10	нМ
AD-738094.1	25,25	3,17	10	нМ
AD-738095.1	8,80	1,79	10	нМ

AD-738096.1	4,36	5,22	10	нМ
AD-738097.1	28,80	6,91	10	нМ
AD-738098.1	10,91	3,70	10	нМ
AD-738099.1	25,30	5,42	10	нМ
AD-738100.1	43,27	10,46	10	нМ
AD-738012.1	3,70	3,79	1	нМ
AD-738013.1	6,87	3,98	1	нМ
AD-738014.1	16,20	4,78	1	нМ
AD-738015.1	15,97	3,04	1	нМ
AD-738016.1	11,33	4,08	1	нМ
AD-738017.1	3,91	2,43	1	нМ
AD-738018.1	9,79	5,33	1	нМ
AD-738019.1	5,90	4,65	1	нМ
AD-738020.1	4,29	7,33	1	нМ
AD-738021.1	11,55	7,48	1	нМ
AD-738022.1	12,06	4,21	1	нМ
AD-738023.1	10,50	4,50	1	нМ
AD-738024.1	12,71	3,60	1	нМ
AD-738025.1	42,61	8,91	1	нМ
AD-738026.1	7,13	2,81	1	нМ
AD-738027.1	1,14	0,44	1	нМ
AD-738028.1	2,99	4,01	1	нМ
AD-738029.1	8,81	4,91	1	нМ
AD-738030.1	15,88	4,68	1	нМ
AD-738031.1	14,42	9,04	1	нМ
AD-738032.1	12,11	3,28	1	нМ
AD-738033.1	17,47	13,61	1	нМ
AD-738034.1	18,58	6,98	1	нМ
AD-738035.1	7,64	6,58	1	нМ
AD-738036.1	2,84	2,90	1	нМ
AD-738037.1	11,17	3,62	1	нМ
AD-738038.1	10,23	4,82	1	нМ
AD-738039.1	9,61	2,76	1	нМ
AD-738040.1	54,47	14,10	1	нМ

AD-738041.1	15,86	6,31	1	нМ
AD-738042.1	15,96	6,61	1	нМ
AD-738043.1	2,26	2,61	1	нМ
AD-738044.1	4,54	4,76	1	нМ
AD-738045.1	25,51	7,28	1	нМ
AD-738046.1	30,32	10,02	1	нМ
AD-738047.1	16,25	7,68	1	нМ
AD-738048.1	9,07	3,25	1	нМ
AD-397217.2	48,16	12,70	1	нМ
AD-738049.1	7,97	3,33	1	нМ
AD-738050.1	5,60	4,81	1	нМ
AD-738051.1	1,49	1,05	1	нМ
AD-738052.1	10,13	2,72	1	нМ
AD-738053.1	10,82	4,44	1	нМ
AD-738054.1	21,52	8,71	1	нМ
AD-738055.1	12,40	3,31	1	нМ
AD-738056.1	5,93	4,14	1	нМ
AD-738057.1	7,63	2,80	1	нМ
AD-738058.1	18,21	4,26	1	нМ
AD-738059.1	14,39	6,00	1	нМ
AD-738060.1	6,71	2,99	1	нМ
AD-738061.1	13,63	3,65	1	нМ
AD-738062.1	6,08	3,37	1	нМ
AD-738063.1	9,63	8,05	1	нМ
AD-738064.1	6,51	4,83	1	нМ
AD-738065.1	9,97	1,82	1	нМ
AD-738066.1	50,95	5,44	1	нМ
AD-738067.1	9,69	2,74	1	нМ
AD-738068.1	9,39	1,51	1	нМ
AD-738069.1	43,67	8,07	1	нМ
AD-738070.1	37,85	4,96	1	нМ
AD-738071.1	2,81	2,93	1	нМ
AD-738072.1	10,65	9,82	1	нМ
AD-738073.1	5,64	2,45	1	нМ

AD-738074.1	10,00	4,11	1	нМ
AD-738075.1	78,16	11,76	1	нМ
AD-738076.1	44,11	8,21	1	нМ
AD-738077.1	11,42	0,98	1	нМ
AD-738078.1	7,65	1,23	1	нМ
AD-738079.1	1,78	2,66	1	нМ
AD-738080.1	7,03	8,36	1	нМ
AD-738081.1	27,43	6,11	1	нМ
AD-738082.1	21,57	4,04	1	нМ
AD-738083.1	10,77	3,72	1	нМ
AD-738084.1	76,60	10,91	1	нМ
AD-738085.1	36,65	7,82	1	нМ
AD-738086.1	26,34	11,70	1	нМ
AD-738087.1	0,56	0,52	1	нМ
AD-738088.1	52,50	10,17	1	нМ
AD-738089.1	12,77	1,25	1	нМ
AD-738090.1	12,92	5,28	1	нМ
AD-738091.1	20,70	1,73	1	нМ
AD-738092.1	58,85	6,24	1	нМ
AD-738093.1	84,82	9,95	1	нМ
AD-738094.1	59,17	6,38	1	нМ
AD-738095.1	12,86	8,99	1	нМ
AD-738096.1	10,61	4,77	1	нМ
AD-738097.1	35,98	1,81	1	нМ
AD-738098.1	14,76	3,12	1	нМ
AD-738099.1	37,99	2,57	1	нМ
AD-738100.1	46,62	7,08	1	нМ
AD-738012.1	11,95	6,41	0,1	нМ
AD-738013.1	11,70	2,86	0,1	нМ
AD-738014.1	33,48	9,61	0,1	нМ
AD-738015.1	25,02	5,00	0,1	нМ
AD-738016.1	22,29	4,67	0,1	нМ
AD-738017.1	21,12	5,92	0,1	нМ
AD-738018.1	15,82	5,90	0,1	нМ

AD-738019.1	22,54	18,17	0,1	нМ
AD-738020.1	12,05	9,08	0,1	нМ
AD-738021.1	19,21	0,85	0,1	нМ
AD-738022.1	24,55	5,38	0,1	нМ
AD-738023.1	17,43	5,05	0,1	нМ
AD-738024.1	24,48	1,96	0,1	нМ
AD-738025.1	72,34	16,04	0,1	нМ
AD-738026.1	44,09	2,91	0,1	нМ
AD-738027.1	16,46	9,70	0,1	нМ
AD-738028.1	13,92	9,68	0,1	нМ
AD-738029.1	25,75	5,87	0,1	нМ
AD-738030.1	42,80	8,11	0,1	нМ
AD-738031.1	43,85	2,58	0,1	нМ
AD-738032.1	29,64	6,11	0,1	нМ
AD-738033.1	42,40	1,69	0,1	нМ
AD-738034.1	49,71	3,53	0,1	нМ
AD-738035.1	30,30	20,42	0,1	нМ
AD-738036.1	12,98	4,90	0,1	нМ
AD-738037.1	13,01	5,34	0,1	нМ
AD-738038.1	15,19	8,17	0,1	нМ
AD-738039.1	18,24	10,33	0,1	нМ
AD-738040.1	60,24	13,10	0,1	нМ
AD-738041.1	26,49	7,47	0,1	нМ
AD-738042.1	18,54	6,11	0,1	нМ
AD-738043.1	5,91	5,08	0,1	нМ
AD-738044.1	14,74	6,15	0,1	нМ
AD-738045.1	55,58	16,72	0,1	нМ
AD-738046.1	68,30	11,74	0,1	нМ
AD-738047.1	40,80	6,70	0,1	нМ
AD-738048.1	32,28	7,47	0,1	нМ
AD-397217.2	76,28	11,27	0,1	нМ
AD-738049.1	22,10	8,60	0,1	нМ
AD-738050.1	8,56	5,26	0,1	нМ
AD-738051.1	19,62	9,00	0,1	нМ

AD-738052.1	29,60	6,17	0,1	нМ
AD-738053.1	19,82	6,73	0,1	нМ
AD-738054.1	48,02	6,33	0,1	нМ
AD-738055.1	26,00	8,90	0,1	нМ
AD-738056.1	34,85	7,55	0,1	нМ
AD-738057.1	30,60	9,35	0,1	нМ
AD-738058.1	49,45	11,76	0,1	нМ
AD-738059.1	40,24	4,74	0,1	нМ
AD-738060.1	37,94	10,19	0,1	нМ
AD-738061.1	49,79	3,08	0,1	нМ
AD-738062.1	28,19	1,51	0,1	нМ
AD-738063.1	30,80	15,24	0,1	нМ
AD-738064.1	25,32	2,67	0,1	нМ
AD-738065.1	34,43	9,76	0,1	нМ
AD-738066.1	87,77	14,39	0,1	нМ
AD-738067.1	36,47	9,15	0,1	нМ
AD-738068.1	28,08	4,14	0,1	нМ
AD-738069.1	97,43	7,31	0,1	нМ
AD-738070.1	82,37	8,24	0,1	нМ
AD-738071.1	27,61	7,94	0,1	нМ
AD-738072.1	37,34	2,31	0,1	нМ
AD-738073.1	25,85	9,17	0,1	нМ
AD-738074.1	41,19	13,50	0,1	нМ
AD-738075.1	93,48	11,50	0,1	нМ
AD-738076.1	66,05	10,10	0,1	нМ
AD-738077.1	32,71	5,69	0,1	нМ
AD-738078.1	35,64	5,42	0,1	нМ
AD-738079.1	20,48	3,52	0,1	нМ
AD-738080.1	36,41	7,72	0,1	нМ
AD-738081.1	65,34	19,91	0,1	нМ
AD-738082.1	53,82	8,31	0,1	нМ
AD-738083.1	30,04	5,11	0,1	нМ
AD-738084.1	88,32	9,40	0,1	нМ
AD-738085.1	78,53	7,08	0,1	нМ

AD-738086.1	82,59	7,90	0,1	нМ
AD-738087.1	13,94	6,27	0,1	нМ
AD-738088.1	73,47	18,72	0,1	нМ
AD-738089.1	48,21	8,12	0,1	нМ
AD-738090.1	43,23	12,93	0,1	нМ
AD-738091.1	52,45	4,67	0,1	нМ
AD-738092.1	75,75	31,47	0,1	нМ
AD-738093.1	88,99	10,31	0,1	нМ
AD-738094.1	82,41	6,94	0,1	нМ
AD-738095.1	51,05	7,29	0,1	нМ
AD-738096.1	31,49	12,31	0,1	нМ
AD-738097.1	64,39	13,12	0,1	нМ
AD-738098.1	33,73	10,09	0,1	нМ
AD-738099.1	69,09	9,27	0,1	нМ
AD-738100.1	75,77	15,74	0,1	нМ

Пример 6. Скрининг *in vivo* с использованием последовательностей APP с затравочными областями с высоким содержанием AU

Скрининг *in vivo* выполняли на мышах C57BL/6 для тестирования олигонуклеотидов, имеющих затравочные области с высоким содержанием AU. Краткое изложение дизайна исследования представлено в таблице 19. Как показано в таблице 20A, тестировали следующие олигонуклеотиды, имеющие затравочные области с высоким содержанием AU: AD-506935.2, AD-507065.2, AD-507159.2, AD-507538.2, AD-507624.2, AD-507724.2, AD-507725.2, AD-507789.2, AD-507874.2, AD-507928.2 и AD-507949.2. В таблице 20A перечислены смысловые, антисмысловые последовательности и последовательности целевых олигонуклеотидов для каждого из этих олигонуклеотидов с высоким содержанием AU. Олигонуклеотид AD-392927.2 (химический состав GNA7 C16) от RLD592 использовали в качестве последовательности положительного контроля. Структуры олигонуклеотидов с высоким содержанием AU показаны на фиг. 14A и 14B. Кроме того, каждый из олигонуклеотидов, имеющих затравочные области с высоким содержанием AU, тестировали в отношении перекрестной реактивности с последовательностями человека (например, анализ выполняли с последовательностью NM_000484), яванского макака (анализ выполняли с последовательностью

XM_005548883), мыши (анализ выполняли с последовательностью NM_001198823), крысы (анализ выполняли с последовательностью NM_019288) и собаки (анализ выполняли с последовательностью NM_001293279), и эти данные обобщены в таблице 20B.

Таблица 19. Дизайн исследования

Обзор	Репликация in vitro	646 APP NM_201414.2
	Мишень	hsAPP
	Цель	Скрининг in vivo с использованием последовательностей с затравочными областями с высоким содержанием AU
AAV	Название	AAV8.HsAPP-CDS3TRNC
		VCAV–04731
	Доза	2E+11
	Метод инъекции	IV (ретроорбитальная)
siRNA	Метод инъекции	Подкожная
	Доза	3 мг/кг
	Образец	Печень
	Дни сбора	D14
Животные	Пол	Самки
	Линия	C57BL/6
	Возраст (при поступлении)	6-8 недель
	Поставщик	Charles River
	Количество дуплексов	12*
	n =	3
	Всего животных	45
Анализ	Метод анализа	RT-qPCR
	Зонд Taqman	APP: Hs00169098_m1 (FAM)
		для GAPDH мыши, Applied Biosystems 4351309 (VIC)
Разное	Контроли	*AD-392927.2 от RLD592 был включен в качестве положительного контроля

Таблица 20A. Дуплекс и целевые последовательности hsAPP для контроля с GNA7 C16 и кандидатов с высоким содержанием AU

Химическая структура (мишень)	Название дуплекса	Смысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Антисмысловая последовательность (5′-3′)	SEQ ID NO	Целевая последовательность мРНК (5′-3′)	SEQ ID NO
GNA7 C16 (APP)	AD-392927.2	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucuL96	2750	asGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2751	n/a	n/a
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-506935.2	asasagagCfaAfAfAfcuauucagauL96	2752	asUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2753	AGAAAGAGCAAAACUAUUCAGAU	2754
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507065.2	ususggccAfaCfAfUfgauuaguguaL96	2755	asUfscacUfaAfUfcaugUfuGfgccaasgsa	2756	UCUUGGCCAACAUGAUUAGUGAA	2757
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507159.2	uscsugggUfuGfAfCfaaauaucaauL96	2758	asUfsugaUfaUfUfugucAfaCfccagasasc	2759	GUUCUGGGUUGACAAAUAUCAAG	2760
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507538.2	ususuaugAfuUfUfAfcucauuaucuL96	2761	asGfsauaAfuGfAfguaaAfuCfauaaasasc	2762	GUUUUAUGAUUUACUCAUUAUCG	2763
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507624.2	asusgccuGfaAfCfUfugaauuaauuL96	2764	asAfsuuaAfuUfCfaaguUfcAfggcauscsu	2765	AGAUGCCUGAACUUGAAUUAAUC	2766
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507724.2	asgsaugcCfuGfAfAfcuugaauuauuL96	2767	asUfsaauUfcAfAfguucAfgGfcaucusasc	2768	GUAGAUGCCUGAACUUGAAUUUAA	2769

Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507725.2	gscscugaAfcUfUfGfaauuaaucc uL96	2770	asGfsgauUfaAfUfucaaGfuUfcaggcsas u	2771	AUGCCUGAACUUGAAUUAA UCCA	2772
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507789.2	gsusgguuUfgUfGfAfcccaauuaa uL96	2773	asUfsuaaUfuGfGfgucaCfaAfaccacsasa	2774	UUGUGGUUUGUGACCCAAU UAAG	2775
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507874.2	csasgaugCfuUfUfAfgagagauuu uL96	2776	asAfsaauCfuCfUfcuaaAfgCfaucugsasa	2777	UUCAGAUGCUUUAGAGAGA UUUU	2778
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507928.2	uscsuugcCfuAfAfGfuauuccuu uuL96	2779	asAfsaagGfaAfUfacuuAfgGfcaagasgsa	2780	UCUCUUGCCUAAGUAUUCC UUUC	2781
Затравочная область с высоким содержанием AU (APP)	AD-507949.2	ususgcugCfuUfCfUfgcuauauu uuL96	2782	asAfsaauAfuAfGfcagaAfgCfagcaasusc	2783	GAUUGCUGCUUCUGCUAUA UUUG	2784

Пояснения к таблице 20A: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат-5′, (Agn) = аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Выбранных кандидатов с высоким содержанием AU оценивали в отношении эффективности *in vivo* в скринингах для идентификации лидерных последовательностей для нокдауна APP человека у мышей с введенным AAV. Вкратце, вектор AAV, несущий APP Homo sapiens (например, hsAPP-CDS3TRNC), вводили внутривенной инъекцией самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель, и через 14 дней после введения AAV мышам вводили подкожной инъекцией выбранное средство для RNAi или контрольное средство (n = 3 на группу) в дозе 3 мг/кг. Группы скрининга обобщены в таблице 21.

Таблица 21. Группы скрининга с использованием кандидатов с высоким содержанием AU на мышах с введенным AAV.

Дата введения siRNA	№ группы	№ животного	Обработка	Доза	Момент времени
8 марта 2019 г.	1	1	PBS	N/A	D14
8 марта 2019 г.	1	2	PBS	N/A	D14
8 марта 2019 г.	1	3	PBS	N/A	D14
8 марта 2019 г.	1	4	PBS	N/A	D14
8 марта 2019 г.	1	5	PBS	N/A	D14
8 марта 2019 г.	2	6	Без воздействия	N/A	D14
8 марта 2019 г.	2	7	Без воздействия	N/A	D14
8 марта 2019 г.	2	8	Без воздействия	N/A	D14
8 марта 2019 г.	2	9	Без воздействия	N/A	D14
8 марта 2019 г.	3	10	AD-392927.2 (от RLD592)	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	3	11	AD-392927.2 (от RLD592)	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	3	12	AD-392927.2 (от RLD592)	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	4	13	AD-506935.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	4	14	AD-506935.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	4	15	AD-506935.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	5	16	AD-507065.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	5	17	AD-507065.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	5	18	AD-507065.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	6	19	AD-507159.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	6	20	AD-507159.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	6	21	AD-507159.2	3 мг/кг	D14

8 марта 2019 г.	7	22	AD-507538.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	7	23	AD-507538.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	7	24	AD-507538.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	8	25	AD-507624.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	8	26	AD-507624.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	8	27	AD-507624.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	9	28	AD-507724.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	9	29	AD-507724.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	9	30	AD-507724.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	10	31	AD-507725.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	10	32	AD-507725.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	10	33	AD-507725.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	11	34	AD-507789.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	11	35	AD-507789.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	11	36	AD-507789.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	12	37	AD-507874.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	12	38	AD-507874.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	12	39	AD-507874.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	13	40	AD-507928.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	13	41	AD-507928.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	13	42	AD-507928.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	14	43	AD-507949.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	14	44	AD-507949.2	3 мг/кг	D14
8 марта 2019 г.	14	45	AD-507949.2	3 мг/кг	D14

Через 14 дней после подкожной инъекции средства для RNAi или контроля мышей умерщвляли и оценивали уровни мРНК APP в печени с помощью qPCR. Как показано в таблице 22 и на фиг. 15, значимые уровни нокдауна мРНК APP человека *in vivo* в печени наблюдали для большинства протестированных средств для RNAi с высоким содержанием AU по сравнению с PBS-контролем и контролем без воздействия (только с AAV), при этом особенно устойчивые уровни нокдауна наблюдали в случае AD-507538.2, AD-507724.2, AD-392927.2 (RLD592), AD-507928.2, AD-506935.2 и AD-507874.2

Таблица 22. Обзор результатов скрининга с использованием кандидатов с высоким содержанием AU на мышах с введенным AAV.

Затравочная область hsAPP с высоким содержанием AU 3 мг/кг, печень, qPCR, D14 % оставшейся мРНК hsAPP относительно обработки PBS		
Обработка	**Групповое среднее значение**	**Стандартное отклонение**
PBS	100,00	30,90
Без воздействия	91,48	6,43
AD-507538.2	24,23	8,73
AD-507724.2	30,90	2,95
AD-392927.2 (RLD592)	32,80	0,92
AD-507928.2	36,31	2,61
AD-506935.2	36,47	5,26
AD-507874.2	40,43	4,99
AD-507789.2	50,24	6,06
AD-507624.2	57,67	4,22
AD-507725.2	68,53	10,04
AD-507159.2	71,49	20,82
AD-507949.2	84,94	2,35
AD-507065.2	91,09	20,17

В таблице 23 показано сравнение нокдауна мРНК hsAPP человека *in vivo* в печени под действием описанных выше средств для RNAi с высоким содержанием AU в дозе 3 мг/кг по сравнению с нокдауном APP *in vitro* под действием тех же средств для RNAi с высоким содержанием AU при концентрации либо 10 нМ, либо 0,1 нМ в обеих линиях клеток DL и Be(2)C.

Таблица 23. Сравнение нокдауна hsAPP *in vivo* и *in vitro*

	RLD	701	RLD 646 (in vitro)							
% оставшегося hsAPP	In vivo 3 мг/кг		DL (двойная-Luc)				Be(2)C (нейрон человека)			
			Доза--	Единица измерения	Доза--	Единица измерения	Доза--	Единица измерения	Доза --	Единица измерения
			10 нМ	10 нМ	0,1 нМ	0,1 нМ	10 нМ	10 нМ	0,1 нМ	0,1 нМ
Дуплекс	Средн.	SD	Средн.	SD	Средн.	SD	Средн.	SD	Средн.	SD
AD-507538	24,2	8,7	22,5	5,5	106,2	45,3	16,6	3,8	23,3	2,5
AD-507724	30,9	2,9	38,5	9,2	119,8	24,6	21,2	1,9	43,5	9,6
AD-507928	36,3	2,6	10,6	1,8	101,1	23,8	25,1	2,7	39,8	22,1
AD-506935	36,5	5,3	37,4	10,1	75,9	18,4	19,7	3,9	22,3	2,2
AD-507874	40,4	5,0	13,6	10,9	105,7	29,1	21,9	2,4	31,3	13,1
AD-507789	50,2	6,1	34,3	12,0	121,2	30,9	24,0	6,0	38,3	3,6
AD-507624	57,7	4,2	32,7	7,0	116,5	28,6	22,1	1,0	68,0	26,2
AD-507725	68,5	10,0	68,6	13,1	107,8	43,5	31,1	5,4	34,1	9,7
AD-507159	71,5	20,8	56,8	20,2	119,7	42,4	26,2	4,6	42,7	8,6
AD-507949	84,9	2,3	57,1	25,6	99,7	29,8	23,3	3,1	42,9	15,2
AD-507065	91,1	20,2	52,5	11,6	106,1	19,2	25,3	7,2	39,4	5,8

Пример 7. Скрининг *in vivo* с использованием лидерных последовательностей APP для исследований взаимосвязи структуры и активности

Для проведения исследований взаимосвязи структуры и активности лидерных олигонуклеотидов выполняли скрининг *in vivo* на мышах C57BL/6. Краткое изложение дизайна исследования представлено в таблице 25. Как показано в таблице 26, тестировали следующие лидерные олигонуклеотиды: AD-886823, AD-886839, AD-886845, AD-886853, AD-886858, AD-886864, AD-886873, AD-886877, AD-886879, AD-886883, AD-886884, AD-886889, AD-886899, AD-886900, AD-886906, AD-886907, AD-886908, AD-886909, AD-886919, AD-886928, AD-886930 и AD-886931. В таблице 26 перечислены смысловая и антисмысловая последовательности для каждого лидерного олигонуклеотида, а также ассоциированная целевая последовательность для каждого лидерного олигонуклеотида. Структуры лидерных олигонуклеотидов показаны на фиг. 16A, фиг. 16B, фиг. 16C и фиг. 16D.

Таблица 25. Дизайн исследования

AAV	Название	AAV8.HsAPP-CDS3TRNC
		VCAV–04731
	Доза	2E+11
	Метод инъекции	IV (ретроорбитальная)
siRNA	Метод инъекции	Подкожная
	Доза	3 мг/кг
	Образец	Печень
	Дни сбора	D14
Животные	Пол	Самки
	Линия	C57BL/6
	Возраст (при поступлении)	6-8 недель
	Поставщик	Jackson Lab
	Количество дуплексов	16
	n =	3
	Всего животных	72
Анализ	Метод анализа	RT-qPCR
	Зонд Taqman	для GAPDH мыши, Applied Biosystems 4351309
		APP: Hs00169098_m1 (FAM)

Таблица 26. Последовательности дуплексов и целевые последовательности hsAPP для лидерных кандидатов SAR

Дуплекс	Нить	Последовательность олигонуклеотида	SEQ ID NO:	Целевая последовательность	SEQ ID NO:
AD-886823.2	Смысловая нить (5′-3′)	usasgug(Chd)AfuGfAfAfuagauucucaL96	2785	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2829
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusGfsagaa(Tgn)cuauucAfuGfcacuasgsu	2786	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2830
AD-886839.2	Смысловая нить (5′-3′)	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2787	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2831
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusdGsagaa(Tgn)cuauucAfudGcacuasgsu	2788	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2832
AD-886845.2	Смысловая нить (5′-3′)	usasgug(Chd)audGadAuagauucucaL96	2789	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2833
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPudGagaa(Tgn)cuauUfcAfudGcacuasgsu	2790	UGAGAATCUAUUCAUGCACUAGU	2834
AD-886853.2	Смысловая нить (5′-3′)	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2791	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2835
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusdGsagdAa(Tgn)cuaudTcAfugcacuasgsu	2792	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2836
AD-886858.2	Смысловая нить (5′-3′)	usasgug(Chd)AfudGAfAfuagauucucaL96	2793	UAGUGCAUGAAUAGAUUCUCA	2837

	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPudGagdAa(Tgn)cuaudTcAfudGcacuasgsu	2794	UGAGAATCUAUTCAUGCACUAGU	2838
AD-886864.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)GfaAfAfAfuccaaccuaaL96	2795	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2839
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcGfuagccsgsu	2796	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2840
AD-886873.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccuaaL96	2797	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2841
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2798	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2842
AD-886877.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccuaaL96	2799	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2843
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2800	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2844
AD-886879.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2801	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2845
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfsaggu(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2802	UUAGGUTGGAUUUUCGUAGCCGU	2846
AD-886883.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2803	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2847
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfaggdT(Tgn)ggauuuUfcdGuagccsgsu	2804	UUAGGTTGGAUUUUCGUAGCCGU	2848

AD-886884.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2805	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2849
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfaggdT(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2806	UUAGGTTGGAUTUUCGUAGCCGU	2850
AD-886889.2	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gaAfAfAfuccaaccuaaL96	2807	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2851
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfagdGu(Tgn)ggaudTuUfcguagccsgsu	2808	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2852
AD-886899.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasagagCfaAfAfAfcuauu(Chd)agaaL96	2809	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2853
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfscugAfaUfAfguuuUfgCfucuuuscsu	2810	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2854
AD-886900.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasaga(Ghd)CfaAfAfAfcuauucagaaL96	2811	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2855
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfscugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2812	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2856
AD-886906.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)aAfAfAfcuauucagaaL96	2813	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2857
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugAfauaguuuUfgCfucuuuscsu	2814	UUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2858
AD-886907.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)aAfaAfcuauucagaaL96	2815	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2859

	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2816	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2860
AD-886908.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)adAadAcuauucagaaL96	2817	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2861
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2818	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2862
AD-886909.2	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)adAadAcuauucagaaL96	2819	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2863
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugdAauagudTuUfgdCucuuuscsu	2820	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2864
AD-886919.2	Смысловая нить (5′-3′)	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuaucaL96	2821	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2865
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusGfsauaAfugaguaaAfuCfauaaasasc	2822	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2866
AD-886928.2	Смысловая нить (5′-3′)	ususuaug(Ahd)uUfudAcucauuaucaL96	2823	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2867
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPudGauadAugagudAaAfudCauaaasasc	2824	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2868
AD-886930.2	Смысловая нить (5′-3′)	ususuaugAfuUfUfAfcuc(Ahd)uuaucaL96	2825	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2869
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2826	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2870

AD-886931.2	Смысловая нить (5′-3′)	ususuaug(Ahd)uUfUfAfcucauuaucaL96	2827	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2871
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusdGsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2828	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2872

Пояснения к таблице 26: U = уридин-3′-фосфат, u = 2′-O-метилуридин-3′-фосфат, us = 2′-O-метилуридин-3′-фосфотиоат, a = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфат, A = аденозин-3′-фосфат, as = 2′-O-метиладенозин-3′-фосфотиоат, (Ahd) = 2′-O-гексадецил-аденозин-3′-фосфат, Gf = 2′-фторгуанозин-3′-фосфат, Uf = 2′-фторуридин-3′-фосфат, Cf = 2′-фторцитидин-3′-фосфат, Af = 2′-фтораденозин-3′-фосфат, cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфат, VP = винилфосфат 5′, (Agn) = нуклеиновая кислота с аденозингликолевыми остатками (GNA), gs = 2′-O-метилгуанозин-3′-фосфотиоат, (Chd) = 2′-O-гексадецилцитидин-3′-фосфат, (Tgn) = нуклеиновая кислота с тимидингликолевыми остатками (GNA), S-изомер, (Ghd) = 2′-O-гексадецил-гуанозин-3′-фосфат и cs = 2′-O-метилцитидин-3′-фосфотиоат.

Выбранных кандидатов оценивали в отношении эффективности *in vivo* в скринингах нокдауна APP человека у мышей с AAV. Вкратце, вектор AAV, несущий APP Homo sapiens (например, AAV8.HsAPP-CDS3TRNC), вводили внутривенной инъекцией самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель и через 14 дней после введения AAV мышам вводили подкожной инъекцией выбранное средство для RNAi или контрольное средство (n = 3 на группу) в дозе 3 мг/кг. Через 14 дней после подкожной инъекции средства для RNAi или контроля мышей умерщвляли и оценивали уровни мРНК APP в печени с помощью qPCR. Как показано в таблице 28, на фиг. 17A и фиг. 17B, значимые уровни нокдауна мРНК APP человека *in vivo* в печени наблюдали для большинства протестированных лидерных средств для RNAi по сравнению с PBS-контролем и контролем без воздействия (только с AAV), при этом особенно устойчивые уровни нокдауна наблюдали в случае AD-886864 (исходное соединение), AD-886873, AD-886879, AD-886883, AD-886884, AD-886889, AD-886899 (исходное соединение), AD-886900, AD-886906, AD-886907, AD-886919 (исходное соединение) и AD-886823 (исходное соединение). Фиг. 18A-18D представляют собой схематические изображения лидерных средств для RNAi, классифицируемых по исходной молекуле: исходному соединению AD-886864 (фиг. 18A), исходному соединению AD-886899 (фиг. 18B), исходному соединению AD-886919 (фиг. 18 C) и исходному соединению AD-886823 (фиг. 18D) соответственно.

Таблица 28. Обзор результатов скрининга *in vivo* с использованием лидерных кандидатов на мышах с введенным AAV.

	3 мг/кг, SC, D14, печень, qPCR	
Обработка	**% оставшейся мРНК**	
	Групповое среднее значение	**Стандартное отклонение**
PBS	100,00	15,26
без воздействия (только с AAV)	104,01	16,49
AD-886864 (исходное соединение)	29,55	0,93
AD-886873	27,48	0,84
AD-886877	33,34	13,46
AD-886879	26,68	2,52
AD-886883	21,74	2,25
AD-886884	28,51	8,66

AD-886889	21,77	1,58
AD-886899 (исходное соединение)	27,17	7,52
AD-886900	20,80	5,81
AD-886906	19,35	5,97
AD-886907	19,12	3,16
AD-886908	30,28	6,67
AD-886909	34,56	5,55
AD-886919 (исходное соединение)	24,16	6,71
AD-886928	40,47	5,03
AD-886930	32,87	6,63
AD-886931	38,82	4,51
AD-886823 (исходное соединение)	27,81	3,36
AD-886853	43,59	9,18
AD-886858	61,16	2,23
AD-886839	60,35	13,85
AD-886845	79,73	10,09

В таблице 29 показан нокдаун APP *in vitro под действием* описанных выше (например, в таблице 26) лидерных средств для RNAi при одной из концентраций 10 нМ или 0,1 нМ в линиях клеток Be(2)C.

Таблица 29. Обзор результатов скрининга *in vitro* в клетках Be(2)C с использованием лидерных кандидатов при концентрации 10 нМ и 0,1 нМ.

Дуплекс	% оставшейся мРНК – 10 нМ	Станд. откл. – 10 нМ	% оставшейся мРНК – 0,1 нМ	Станд. откл. – 0,1 нМ
AD-886823.1	7,0	5,4	91,0	25,7
AD-886845.1	13,3	3,2	67,4	7,9
AD-886839.2	10,2	7,7	74,7	39,5
AD-886853.1	6,5	3,9	44,9	7,4
AD-886858.1	11,4	2,4	61,4	12,5
AD-886864.1	11,5	3,9	44,9	7,9
AD-886873.1	12,7	1,9	60,2	14,3
AD-886877.1	11,9	3,0	67,8	5,9

AD-886879.1	9,8	1,7	41,0	5,2
AD-886883.1	8,5	2,1	29,5	12,8
AD-886884.1	8,9	2,4	31,2	11,9
AD-886889.1	9,4	0,6	28,0	14,2
AD-886899.1	9,2	2,6	40,5	12,7
AD-886900.1	6,7	2,1	39,7	21,5
AD-886906.1	10,2	3,0	39,7	9,9
AD-886907.1	9,8	2,7	30,3	1,9
AD-886908.1	10,7	2,6	32,8	10,6
AD-886909.1	7,4	1,4	77,9	16,2
AD-886919.1	5,7	1,4	31,2	4,3
AD-886928.1	9,2	2,4	67,6	7,1
AD-886930.1	6,9	1,7	45,7	10,1
AD-886931.1	3,2	1,2	42,0	16,0

Пример 8. Нокдаун APP *in vivo* у отличных от человека приматов под действием конъюгатов siRNA и C-16

Поскольку конъюгат siRNA, AD-454844, продемонстрировал свою эффективность, исследования взаимосвязи структуры и активности проводили на AD-454844, а затем 5 новых C16-соединений идентифицировали в качестве лидерных соединений, исходя из скрининга *in vivo* у яванского макака в отношении растворимого APP. Эффекты нокдауна *in vivo* под действием конъюгатов siRNA и C16 оценивали у яванских макаков, получавших 60 мг AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 или AD-961586 путем интратекального введения с помощью подкожной иглы в поясничную цистерну между L2/L3 или L4/L5 (фиг. 20A-20G). Биомаркеры взаимодействия с мишенью, представляющие собой растворимые APP-альфа и -бета, оценивали в CSF, собранной в D8, D15 и D29 после введения дозы. IT введение дозы приводило к достаточной степени доставки siRNA по всему спинному мозгу и головному мозгу, на что указывает сайленсинг биомаркеров взаимодействия с мишенью уже через одну неделю после введения дозы с продолжительной активностью вплоть до D29. Примечательно, что активность нокдауна *in vivo* под действием конъюгата с 5′-концевым C16 (AD-994379) была аналогична таковой для конъюгата с

внутренним C16 (AD-454844). (Антисмысловая последовательность для обеих протестированных молекул являет я идентичной).

Кроме того, конъюгаты siRNA и C16 демонстрировали значимый длительный эффект нокдауна. Продолжительные фармакодинамические эффекты, при которых содержание растворимого APP оставалось значительно ниже 50% в течение 4-месячного периода, наблюдали после введения AD-454844 в виде однократной дозы 60 мг (фиг. 19 и 20A).

Таблица 30. Конъюгаты siRNA и C16, которые были идентифицированы как осуществляющие нокдаун APP в исследованиях *in vivo* у NHP

Дуплекс	Нить	Последовательность олигонуклеотида	SEQ ID NO:	Целевая последовательность	SEQ ID NO:
AD-994379	Смысловая нить (5′-3′)	Q363sasaaaucCfaAfCfCfuacaaguuscsa	2873	CGAAAAUCCAACCUACAAGUUCU	2883
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusGfsaacu(Tgn)guagguUfgGfauuuuscsg	2874	AGAACUUGUAGGUUGGAUUUUCG	2884
AD-961583	Смысловая нить (5′-3′)	gsgscua(Chd)gadAadAuccaaccusasa	2875	ACGGCUACGAAAAUCCAACCUAC	2885
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusUfsaggu(Tgn)ggaudTuUfcdGuagccsgsu	2876	GUAGGUUGGAUUUUCGUAGCCGU	2886
AD-961584	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)aAfaAfcuauucagsasa	2877	AGAAAGAGCAAAACUAUUCAGAU	2887
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugAfauagudTuUfgCfucuuuscsu	2878	AUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2888
AD-961585	Смысловая нить (5′-3′)	asasagag(Chd)adAadAcuauucagsasa	2879	AGAAAGAGCAAAACUAUUCAGAU	2889
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPuUfcugdAauagudTuUfgdCucuuuscsu	2880	AUCUGAAUAGUUUUGCUCUUUCU	2890
AD-961586	Смысловая нить (5′-3′)	ususuau(Ghd)AfuUfUfAfcucauuauscsa	2881	GUUUUAUGAUUUACUCAUUAUCG	2891
	Антисмысловая нить (5′-3′)	VPusGfsauaAfugaguaaAfuCfauaaasusg	2882	CGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAAC	2892

Таблица 31. Транскрипты с немодифицированными основаниями, используемые в конъюгатах с C16 из таблицы 30

Дуплекс	Нить	Название олигонуклеотидов	Последовательность транскрипта	SEQ ID NO:
AD-994379	Смысловая нить (5′-3′)	A-1701871.1	AAAAUCCAACCUACAAGUUCA	2893
	Антисмысловая нить (5′-3′)	A-882382.1	UGAACUTGUAGGUUGGAUUUUCG	2894
AD-961583	Смысловая нить (5′-3′)	A-1770584.1	GGCUACGAAAAUCCAACCUAA	2895
	Антисмысловая нить (5′-3′)	A-1683088.1	UUAGGUTGGAUTUUCGUAGCCGU	2896
AD-961584	Смысловая нить (5′-3′)	A-1770585.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2897
	Антисмысловая нить (5′-3′)	A-1683116.1	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2898
AD-961585	Смысловая нить (5′-3′)	A-1770586.1	AAAGAGCAAAACUAUUCAGAA	2899
	Антисмысловая нить (5′-3′)	A-1683118.1	UUCUGAAUAGUTUUGCUCUUUCU	2900
AD-961586	Смысловая нить (5′-3′)	A-1770587.1	UUUAUGAUUUACUCAUUAUCA	2901
	Антисмысловая нить (5′-3′)	A-1683134.1	UGAUAAUGAGUAAAUCAUAAAUG	2902

Формула изобретения

1. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и

где указанная антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, перечисленных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

2. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить,

где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из последовательностей смысловой нити, приведенных в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30; и

где указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити, приведенных в таблицах 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

3. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) по п. 1 или п. 2, где по меньшей мере одна из указанной смысловой нити и указанной антисмысловой нити содержит один или более липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или более внутренними нуклеотидными положениями необязательно посредством линкера или носителя.

4. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное средство на основе dsRNA содержит смысловую нить и антисмысловую нить,

где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, где замена на урацил любого тимина из

SEQ ID NO: 1-14 не считается отличием, которое вносит вклад в указанное отличие, составляющее не более 3 нуклеотидов от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14; и

где указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28, где замена на урацил любого тимина из SEQ ID NO: 15-28 не считается отличием, которое вносит вклад в указанное отличие, составляющее не более 3 нуклеотидов от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28,

где по меньшей мере одна из указанной смысловой нити и указанной антисмысловой нити содержит один или более липофильных фрагментов, конъюгированных с одним или более внутренними нуклеотидными положениями необязательно посредством линкера или носителя.

5. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) по любому из пп. 1-4, где смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности. представляющей собой нуклеотидную последовательность смысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-

392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738, AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 и AD-961586.

6. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) по любому из пп. 1-4, где антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от антисмысловой нуклеотидной последовательности дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-

392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738, AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 и AD-961586.

7. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1 или п. 2, где двухнитевое средство для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

8. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6, где липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью $\log K_{ow}$, превышает 0.

9. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где гидрофобность двухнитевого средства для RNAi, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови для двухнитевого средства для RNAi, превышает 0,2.

10. Двухнитевое средство для RNAi по п. 9, где анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с применением белка, представляющего собой сывороточный альбумин человека.

11. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-10, где все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

12. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-10, где практически все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

13. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-10, где все нуклеотиды смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

14. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-10, где все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

15. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-10, где все нуклеотиды смысловой нити и все нуклеотиды антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

16. Двухнитевое средство для RNAi по любому из п. 7 и пп. 11-15, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3′-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2′-O-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′-O-аллил-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, 2′-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2′-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2′-O-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 5′-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5′-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5′-фосфат или имитатор 5′-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфат, нуклеотида,

содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2′-дезокситимидин-3′-фосфат, нуклеотида, содержащего 2′-дезоксигуанозин-3′-фосфат, и концевого нуклеотида, связанного с холестериловым производным и бисдециламидной группой додекановой кислоты.

17. Двухнитевое средство для RNAi по п. 16, где указанный модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2′-дезокси-2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-дезокси-модифицированного нуклеотида, 3′-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), запертого нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2′-амино-модифицированного нуклеотида, 2′-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего не встречающееся в природе основание.

18. Двухнитевое средство для RNAi по п. 16, где указанный модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3′-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

19. Двухнитевое средство для RNAi по п. 16, где модификации нуклеотидов представляют собой 2′-О-метил-, GNA- и 2′-фтор-модификации.

20. Двухнитевое средство для RNAi по п. 16, дополнительно содержащее по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

21. Двухнитевое средство для RNAi по п. 20, где двухнитевое средство для RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

22. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1, где длина участка комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов.

23. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1, где длина участка комплементарности составляет 19-23 нуклеотида.

24. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1, где длина участка комплементарности составляет 19 нуклеотидов.

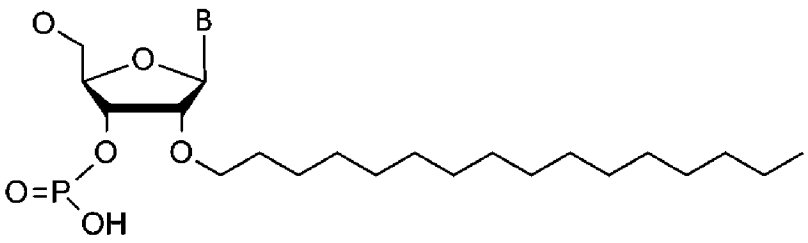
25. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где длина каждой нити составляет не более 30 нуклеотидов.

26. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

27. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере одна нить содержит 3′-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

28. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где двухнитевое средство для RNAi дополнительно содержит C16-лиганд, конъюгированный с 3′-концом, 5′-концом или 3′-концом и 5′-концом смысловой нити посредством одновалентного или разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера.

29. Двухнитевое средство для RNAi по п. 28, где лиганд представляет собой



,

где B представляет собой нуклеотидное основание или аналог нуклеотидного основания, необязательно где B выбран из группы, состоящей из аденина, гуанина, цитозина, тимина и урацила.

30. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1, где участок комплементарности содержит любую из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

31. Двухнитевое средство для RNAi по п. 1, где участок комплементарности состоит из любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6, 9, 10-15, 16A, 16B, 26 и 30.

32. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6 и пп. 8-10, где внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений на каждом конце нити.

33. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32, где внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений на каждом конце нити.

34. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32 или п. 33, где внутренние положения исключают участок сайта расщепления смысловой нити.

35. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32, где внутренние положения исключают положения 9-12, считая от 5′-конца смысловой нити.

36. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32, где внутренние положения исключают положения 11-13, считая от 3′-конца смысловой нити.

37. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32 или п. 33, где внутренние положения исключают участок сайта расщепления антисмысловой нити.

38. Двухнитевое средство для RNAi по п. 37, где внутренние положения исключают положения 12-14, считая от 5′-конца антисмысловой нити.

39. Двухнитевое средство для RNAi по п. 32 или п. 33, где внутренние положения исключают положения 11-13 смысловой нити, считая от 3′-конца, и положения 12-14 антисмысловой нити, считая от 5′-конца.

40. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6, где один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более из следующих внутренних положений: положениями 4-8 и 13-18 смысловой нити и положениями 6-10 и 15-18 антисмысловой нити, считая от 5′-конца каждой нити.

41. Двухнитевое средство для RNAi по п. 40, где один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более из следующих внутренних положений: положениями 5, 6, 7, 15 и 17 смысловой нити и положениями 15 и 17 антисмысловой нити, считая от 5′-конца каждой нити.

42. Двухнитевое средство для RNAi по п. 3 или п. 4, где липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

43. Двухнитевое средство для RNAi по п. 3 или п. 4, где липофильный фрагмент представляет собой липид, холестерин, ретиноевую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-O-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексианол, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин.

44. Двухнитевое средство для RNAi по п. 3 или п. 4, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_4-C_{30}углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

45. Двухнитевое средство для RNAi по п. 44, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_6-C_{18}углеводородную цепь.

46. Двухнитевое средство для RNAi по п. 45, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C_{16}углеводородную цепь.

47. Двухнитевое средство для RNAi по п. 3 или п. 4, где липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который замещает один или более нуклеотидов во внутреннем(-их) положении(-ях).

48. Двухнитевое средство для RNAi по п. 47, где носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на сериноловом остове или диэтаноламиновом остове.

49. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6 и пп. 8-48, где липофильный фрагмент конъюгирован с двухнитевым средством для RNAi

посредством линкера, содержащего простой эфир, тиоэфир, мочевину, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

50. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6 и пп. 8-49, где липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

51. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащее фосфат или имитатор фосфата на 5′-конце антисмысловой нити.

52. Двухнитевое средство для RNAi по п. 51, где имитатор фосфата представляет собой 5′-винилфосфонат (VP).

53. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащее нацеливающий лиганд, который нацеливается на рецептор, который опосредует доставку в ткань ЦНС.

54. Двухнитевое средство для RNAi по п. 53, где нацеливающий лиганд представляет собой C16-лиганд.

55. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, дополнительно содержащее нацеливающий лиганд, который нацеливается на ткань головного мозга.

56. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгированы посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов из галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

57. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 3-6 и пп. 8-56, где 3′-конец смысловой нити защищен концевой кэппирующей группой, которая представляет собой циклическую группу, содержащую амин, при этом указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила,

оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

58. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где средство для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), и нуклеотида, содержащего винилфосфат, необязательно где средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой из следующих модификаций: 2′-O-метил-модифицированный нуклеотид, 2′-фтор-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), и нуклеотид, содержащий винилфосфат.

59. Двухнитевое средство для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где средство для RNAi содержит паттерн модифицированных нуклеотидов, показанный на фиг. 1A, фиг. 1B, в таблице 2A или таблице 5A (где местоположение 2′-C16-, 2′-O-метил, GNA-, фосфотиоатных и 2′-фтор-модификаций является таким, как показано на фиг. 1A, фиг. 1B, в таблице 2A или таблице 5A, независимо от индивидуальных последовательностей нуклеотидных оснований показанных средств для RNAi).

60. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (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 N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

61. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где i составляет 0; j составляет 0; i составляет 1; j составляет 1; оба i и j составляют 0, или оба i и j составляют 1.

62. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где k составляет 0; l составляет 0; k составляет 1; l составляет 1; оба k и l составляют 0, или оба k и l составляют 1.

63. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где XXX комплементарен X′X′X′, YYY комплементарен Y′Y′Y′, и ZZZ комплементарен Z′Z′Z′.

64. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

65. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где мотив Y′Y′Y′ находится в положениях 11, 12 и 13 от 5′-конца антисмысловой нити.

66. Двухнитевое средство для RNAi по п. 65, где Y′ представляет собой 2′-O-метил.

67. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a -Y Y Y -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y′Y′Y′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIa).

68. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y′Y′Y′-$N_{b'}$-Z′Z′Z′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIb),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

69. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a –X X X -N_b -Y Y Y -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- X′X′X′-$N_{b'}$- Y′Y′Y′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIIc),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

70. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где формула (III) представлена формулой (IIId):

смысловая нить: 5′ n_p -N_a –X X X- N_b -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3′

антисмысловая нить: 3′ $n_{p'}$-$N_{a'}$- X′X′X′- $N_{b'}$-Y′Y′Y′-$N_{b'}$-Z′Z′Z′- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5′ (IIId),

где каждый N_b и N_b′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, а каждый N_a и N_a′ независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

71. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где длина двухнитевого участка составляет 15-30 пар нуклеотидов.

72. Двухнитевое средство для RNAi по п. 71, где длина двухнитевого участка составляет 17-23 пары нуклеотидов.

73. Двухнитевое средство для RNAi по п. 71, где длина двухнитевого участка составляет 17-25 пар нуклеотидов.

74. Двухнитевое средство для RNAi по п. 71, где длина двухнитевого участка составляет 23-27 пар нуклеотидов.

75. Двухнитевое средство для RNAi по п. 71, где длина двухнитевого участка составляет 19-21 пару нуклеотидов.

76. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где длина двухнитевого участка составляет 21-23 пары нуклеотидов.

77. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов.

78. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

79. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), HNA, CeNA, 2′-метоксиэтила, 2′-O-алкила, 2′-O-аллила, 2′-C-аллила, 2′-фтора, 2′-дезокси, 2′-гидроксила и их комбинаций, предпочтительно где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из 2′-O-метила, 2′-фтора, GNA и их комбинаций.

80. Двухнитевое средство для RNAi по п. 79, где модификации нуклеотидов представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации.

81. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где лиганд представляет собой один или более C16-фрагментов, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

82. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где лиганд присоединен к 3′-концу, 5′-концу или 3′- и 5′-концу смысловой нити.

83. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где указанное средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

84. Двухнитевое средство для RNAi по п. 83, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3′-конце одной нити.

85. Двухнитевое средство для RNAi по п. 84, где указанная нить представляет собой антисмысловую нить.

86. Двухнитевое средство для RNAi по п. 84, где указанная нить представляет собой смысловую нить.

87. Двухнитевое средство для RNAi по п. 83, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5′-конце одной нити.

88. Двухнитевое средство для RNAi по п. 87, где указанная нить представляет собой антисмысловую нить.

89. Двухнитевое средство для RNAi по п. 87, где указанная нить представляет собой смысловую нить.

90. Двухнитевое средство для RNAi по п. 83, где фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5′-, так и на 3′-конце одной нити.

91. Двухнитевое средство для RNAi по п. 90, где указанная нить представляет собой антисмысловую нить.

92. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где пара оснований в положении 1 от 5′-конца антисмысловой нити дуплекса представляет собой пару оснований AU.

93. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где нуклеотиды Y содержат 2′-фтор-модификацию.

94. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где нуклеотиды Y′ содержат 2′-O-метил-модификацию.

95. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где p′>0.

96. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где p′=2.

97. Двухнитевое средство для RNAi по п. 96, где q′=0, p=0, q=0, а нуклеотиды выступающего конца p′ комплементарны целевой мРНК.

98. Двухнитевое средство для RNAi по п. 96, где q′=0, p=0, q=0, а нуклеотиды выступающего конца p′ не комплементарны целевой мРНК.

99. Двухнитевое средство для RNAi по п. 90, где смысловая нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

100. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 95-99, где по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи.

101. Двухнитевое средство для RNAi по п. 100, где все n_p' связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

102. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где указанное средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, перечисленных в любой из таблиц 2A, 2B, 3, 5A, 5B, 6 и 9.

103. Двухнитевое средство для RNAi по п. 60, где все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити содержат модификацию.

104. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\,3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\,5'$ (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 N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

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

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

105. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III),

где

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил-, гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA) или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом.

106. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить,

комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III),

где

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

107. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

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

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III),

где

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

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый N_b и N_b' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями;

каждый из XXX, YYY, ZZZ, X′X′X′, Y′Y′Y′ и Z′Z′Z′ независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

модификации N_b отличаются от модификации Y, а модификации N_b' отличаются от модификации Y′;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

108. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где указанная антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей APP, где длина каждой нити составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, где указанное двухнитевое средство для RNAi представлено формулой (III):

смысловая нить: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}Y\ Y\ Y\text{ - }N_a\text{ - }n_q\ 3'$

антисмысловая нить: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{- }Y'Y'Y'\text{- }N_a'\text{- }n_q'\ 5'$ (IIIa),

где

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

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

$n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый N_a и N_a' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются либо модифицированными, либо немодифицированными, либо их комбинациями, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два нуклеотида с отличающимися модификациями;

каждый из YYY и Y′Y′Y′ независимо представляет один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации представляют собой 2′-O-метил- или 2′-фтор-модификации;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована с по меньшей мере одним лигандом, необязательно где лиганд представляет собой один или более C16-лигандов.

109. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP),

где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, и указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28,

где практически все нуклеотиды указанной смысловой нити содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2′-O-метил-модификации и 2′-фтор-модификации,

где указанная смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5′-конце,

где практически все нуклеотиды указанной антисмысловой нити содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2′-O-метил-модификации и 2′-фтор-модификации,

где указанная антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5′-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3′-конце, и

где указанная смысловая нить конъюгирована с одним или более C16-лигандами.

110. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP),

где указанное двухнитевое средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок,

где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 1-14, и указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей под SEQ ID NO: 15-28,

где указанная смысловая нить содержит по меньшей мере один 3′-концевой дезокситиминовый нуклеотид (dT), и

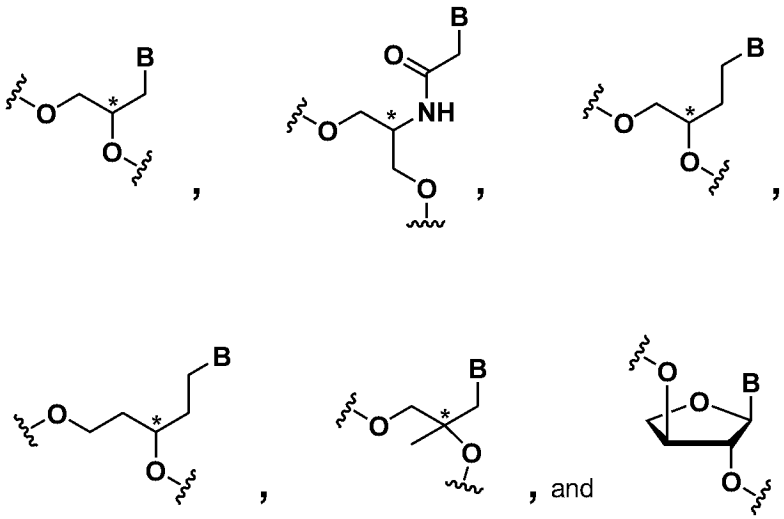
где указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере один 3′-концевой дезокситиминовый нуклеотид (dT).

111. Двухнитевое средство для RNAi по п. 109, где все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды.

112. Двухнитевое средство для RNAi по п. 109 или п. 110, где каждая нить содержит 19-30 нуклеотидов.

113. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-112, где антисмысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере одну нарушающую термостабильность дуплекса модификацию в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5′-участка или его предшественника.

114. Двухнитевое средство для RNAi по п. 114, где нарушающая термостабильность дуплекса модификация выбрана из группы, состоящей из:



где B представляет собой нуклеиновое основание.

115. Клетка, содержащая двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168.

116. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена APP, содержащая двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168.

117. Фармацевтическая композиция по п. 116, где двухнитевое средство для RNAi вводится в незабуференном растворе.

118. Фармацевтическая композиция по п. 117, где указанный незабуференный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

119. Фармацевтическая композиция по п. 116, где указанное двухнитевое средство для RNAi вводится с буферным раствором.

120. Фармацевтическая композиция по п. 119, где указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

121. Фармацевтическая композиция по п. 119, где указанный буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS).

122. Фармацевтическая композиция, содержащая двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168 и липидный состав.

123. Фармацевтическая композиция по п. 122, где липидный состав предусматривает LNP.

124. Способ ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP) в клетке, включающий:

(a) приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168 или фармацевтической композицией по любому из пп. 114-121; и

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

125. Способ по п. 124, где указанная клетка находится в организме субъекта.

126. Способ по п. 125, где субъектом является человек.

127. Способ по п. 125, где субъект выбран из группы, состоящей из макака-резуса, яванского макака, мыши и крысы.

128. Способ по п. 126, где субъект-человек страдает от ассоциированного с APP нарушения.

129. Способ по п. 128, где ассоциированное с APP заболевание представляет собой церебральную амилоидную ангиопатию (CAA).

130. Способ по п. 128, где ассоциированное с APP нарушение представляет собой семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

131. Способ по п. 128, где ассоциированное с APP нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера (AD).

132. Способ по любому из пп. 124-131, где экспрессия APP ингибируется на по меньшей мере приблизительно 30%.

133. Способ лечения субъекта, имеющего нарушение, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии APP, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по любому

из пп. 1-114 или пп. 151-168 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-123, за счет чего осуществляется лечение указанного субъекта.

134. Способ по п. 133, где субъект страдает от ассоциированного с APP нарушения.

135. Способ по п. 133, где субъектом является человек.

136. Способ по п. 134, где ассоциированное с APP заболевание представляет собой церебральную амилоидную ангиопатию (CAA).

137. Способ по п. 134, где ассоциированное с APP заболевание представляет собой семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

138. Способ по п. 134, где ассоциированное с APP заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера (AD).

139. Способ по любому из пп. 133-138, где экспрессия APP ингибируется на по меньшей мере приблизительно 30%.

140. Способ по любому из пп. 133-139, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

141. Способ по любому из пп. 133-140, где двухнитевое средство для RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

142. Способ по любому из пп. 133-141, где двухнитевое средство для RNAi вводят субъекту интратекально.

143. Способ по любому из пп. 133-142, где введение субъекту двухнитевого средства для RNAi обеспечивает уменьшение накопления Aβ, необязательно введение субъекту двухнитевого средства для RNAi обеспечивает уменьшение накопления Aβ(1-40) и/или Aβ (1-42).

144. Способ по любому из пп. 133-143, где введение субъекту dsRNA обеспечивает уменьшение образования и/или накопления амилоидных бляшек у субъекта.

145. Способ по п. 133, где способ приводит к снижению экспрессии целевого гена в ткани головного мозга или спинного мозга.

146. Способ по п. 145, где ткань головного мозга или спинного мозга выбрана из группы, состоящей из ткани коры, мозжечка, полосатого тела, шейного отдела спинного мозга, поясничного отдела спинного мозга и грудного отдела спинного мозга.

147. Способ ингибирования экспрессии APP у субъекта, при этом способ включает

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-123, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии APP у указанного субъекта.

148. Способ лечения или предупреждения ассоциированного с APP заболевания или нарушения у субъекта, при этом способ включает

введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества двухнитевого средства для RNAi по любому из пп. 1-114 или пп. 151-168 или фармацевтической композиции по любому из пп. 116-123, за счет чего осуществляется лечение или предупреждение ассоциированного с APP заболевания или нарушения у субъекта.

149. Способ по п. 148, где ассоциированное с APP заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из церебральной амилоидной ангиопатии (CAA) и болезни Альцгеймера (AD), необязательно где AD представляет собой семейную болезнь Альцгеймера с ранним началом (EOFAD).

150. Набор для осуществления способа по любому из пп. 124-149, содержащий:

a) двухнитевое средство для RNAi, и

b) инструкции по применению, и

c) необязательно средства для введения двухнитевого средства для RNAi субъекту.

151. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и

где указанная антисмысловая нить содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более 3

нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой нити дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-392911, AD-392912, AD-392816, AD-392704, AD-392843, AD-392855, AD-392840, AD-392835, AD-392729, AD-392916, AD-392876, AD-392863, AD-392917, AD-392783, AD-392765, AD-392791, AD-392800, AD-392711, AD-392801, AD-392826, AD-392818, AD-392792, AD-392802, AD-392766, AD-392767, AD-392834, AD-392974, AD-392784, AD-392744, AD-392752, AD-392737, AD-392918, AD-392919, AD-392803, AD-392804, AD-392827, AD-392828, AD-392785, AD-392829, AD-392920, AD-392921, AD-392768, AD-392805, AD-392769, AD-392753, AD-392714, AD-392703, AD-392715, AD-392836, AD-392966, AD-392832, AD-392972, AD-392961, AD-392967, AD-392894, AD-392864, AD-392865, AD-392922, AD-392833, AD-392968, AD-392962, AD-392963, AD-392969, AD-392973, AD-392923, AD-392866, AD-392877, AD-392707, AD-392926, AD-392927, AD-392717, AD-392700, AD-392878, AD-392718, AD-392929, AD-392819, AD-392745, AD-392770, AD-392806, AD-392771, AD-392820, AD-392821, AD-392786, AD-392772, AD-392699, AD-392868, AD-392719, AD-392880, AD-392930, AD-392932, AD-392869, AD-392870, AD-392896, AD-392720, AD-392746, AD-392773, AD-392807, AD-392730, AD-392721, AD-392933, AD-392881, AD-392897, AD-392898, AD-392899, AD-392935, AD-392882, AD-392738, AD-392739, AD-392936, AD-392900, AD-392901, AD-392937, AD-392883, AD-392975, AD-392938, AD-392902, AD-392941, AD-392942, AD-392943, AD-392944, AD-392903, AD-392775, AD-392758, AD-392945, AD-392884, AD-392947, AD-392748, AD-392759, AD-392837, AD-392970, AD-392976, AD-392965, AD-392831, AD-392904, AD-392885, AD-392886, AD-392776, AD-392887, AD-392722, AD-392760, AD-392731, AD-392709, AD-392723, AD-392948, AD-392724, AD-392949, AD-392725, AD-392950, AD-392732, AD-392726, AD-392862, AD-392951, AD-392871, AD-392872, AD-397183, AD-397175, AD-397177, AD-397176, AD-397260, AD-397266, AD-397267, AD-397178, AD-397180, AD-397184, AD-397179, AD-397224, AD-397225, AD-397203, AD-397185, AD-397195, AD-397204, AD-397191, AD-397251, AD-397240, AD-397205, AD-397254, AD-397259, AD-397247, AD-397233, AD-397181, AD-397196, AD-397197, AD-397226, AD-397212, AD-397182, AD-397227, AD-397217, AD-397213, AD-397229, AD-397264, AD-397265, AD-397209, AD-397192, AD-397210, AD-397219, AD-397214, AD-397220, AD-397230, AD-397231, AD-397193, AD-397190, AD-397200, AD-397248, AD-397207, AD-397211, AD-397243, AD-397246, AD-397223, AD-397202, AD-397256, AD-397257, AD-397258, AD-397250, AD-397244, AD-454972, AD-454973, AD-454842, AD-454843, AD-454844, AD-994379, AD-961583, AD-961584, AD-961585 и AD-961586.

152. Двухнитевое средство для RNAi по п. 151, где средство для RNAi содержит одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата (PS) и винилфосфоната (VP), необязательно где указанное средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой модификации, выбранной из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата и винилфосфоната (VP).

153. Двухнитевое средство для RNAi по п. 151 или п. 152, где средство для RNAi содержит четыре или более PS-модификаций, необязательно от шести до десяти PS-модификаций, необязательно восемь PS-модификаций.

154. Двухнитевое средство для RNAi по п. 153, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит восемь PS-модификаций, расположенных при предпоследней и последней межнуклеотидных связях от соответствующих 3′- и 5′-концов каждой из смысловой и антисмысловой нитей средства для RNAi.

155. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 151-154, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит только один нуклеотид, содержащий GNA, необязательно где нуклеотид, содержащий GNA, расположен на антисмысловой нити в седьмом остатке нуклеинового основания от 5′-конца антисмысловой нити.

156. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 151-155, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит от одного до четырех 2′-C-алкил-модифицированных нуклеотида, необязательно где 2′-C-алкил-модифицированный нуклеотид представляет собой 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно где средство для RNAi содержит один 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно один 2′-C16-модифицированный нуклеотид расположен на смысловой

нити в положении шестого нуклеинового основания от 5′-конца смысловой нити или в положении концевого нуклеинового основания 5′-конца.

157. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 151-156, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида, необязательно где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида, необязательно где 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды расположены на смысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 2, 14 и 16 от 5м-конца антисмысловой нити.

158. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 151-157, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит одну или более VP-модификаций, необязательно где средство для RNAi содержит одну VP-модификацию на 5′-конце антисмысловой нити.

159. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 151-158, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида, необязательно где средство для RNAi содержит 2′-O-метил-модифицированные нуклеотиды во всех положениях нуклеиновых оснований, не модифицированных 2′-фтором, 2′-C-алкилом или гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), необязательно где два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида расположены на смысловой нити в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 от 5′-конца антисмысловой нити.

160. Средство на основе двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (для RNAi) для ингибирования экспрессии гена белка-предшественника амилоида (APP), где указанное средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить, и

где указанная антисмысловая нить содержит участок длиной по меньшей мере 15 смежных нуклеиновых оснований, который является в достаточной степени комплементарным целевой последовательности APP, выбранной из группы, состоящей из APP NM_00484 в положениях 1891-1919; APP NM_00484 в положениях 2282-2306; APP NM_00484 в положениях положений 2464-2494; APP NM_00484 в положениях 2475-2638; APP NM_00484 в положениях 2621-2689; APP NM_00484 в положениях 2682-2725; APP NM_00484 в положениях 2705-2746; APP NM_00484 в положениях 2726-2771; APP NM_00484 в положениях 2754-2788; APP NM_00484 в положениях 2782-2813; APP NM_00484 в положениях 2801-2826; APP NM_00484 в положениях 2847-2890; APP NM_00484 в положениях 2871-2896; APP NM_00484 в положениях 2882-2960; APP NM_00484 в положениях 2942-2971; APP NM_00484 в положениях 2951-3057; APP NM_00484 в положениях 3172-3223; APP NM_00484 в положениях 3209-3235; NM_00484 в положениях 3256-3289; APP NM_00484 в положениях 3302-3338; APP NM_00484 в положениях 3318-3353; APP NM_00484 в положениях 3334-3361, APP NM_001198823.1 в положениях 251-284; APP NM_001198823.1 в положениях 362-404; APP NM_001198823.1 в положениях 471-510; APP NM_001198823.1 в положениях 532-587; APP NM_001198823.1 в положениях 601-649; APP NM_001198823.1 в положениях 633-662; APP NM_001198823.1 в положениях 1351-1388; APP NM_001198823.1 в положениях 1609-1649; APP NM_001198823.1 в положениях 1675-1698; APP NM_001198823.1 в положениях 1752-1787; APP NM_001198823.1 в положениях 2165-2217; APP NM_001198823.1 в положениях 2280-2344 и APP NM_001198823.1 в положениях 2403-2431, для осуществления нокдауна APP, и который отличается не более 3 нуклеотидами на протяжении указанных по меньшей мере 15 смежных нуклеиновых оснований, в достаточной степени комплементарных указанной целевой последовательности APP для осуществления нокдауна APP.

161. Двухнитевое средство для RNAi по п. 160, где средство для RNAi содержит одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата (PS) и винилфосфоната (VP), необязательно где указанное средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из каждой модификации, выбранной из группы, состоящей из 2′-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2′-

фтор-модифицированного нуклеотида, 2′-C-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), фосфотиоата и винилфосфоната (VP).

162. Двухнитевое средство для RNAi по п. 160 или п. 161, где средство для RNAi содержит четыре или более PS-модификаций, необязательно от шести до десяти PS-модификаций, необязательно восемь PS-модификаций.

163. Двухнитевое средство для RNAi по п. 162, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит восемь PS-модификаций, расположенных при предпоследней и последней межнуклеотидных связях от соответствующих 3′- и 5′-концов каждой из смысловой и антисмысловой нитей средства для RNAi.

164. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 160-163, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит только один нуклеотид, содержащий GNA, необязательно где нуклеотид, содержащий GNA, расположен на антисмысловой нити в седьмом остатке нуклеинового основания от 5′-конца антисмысловой нити.

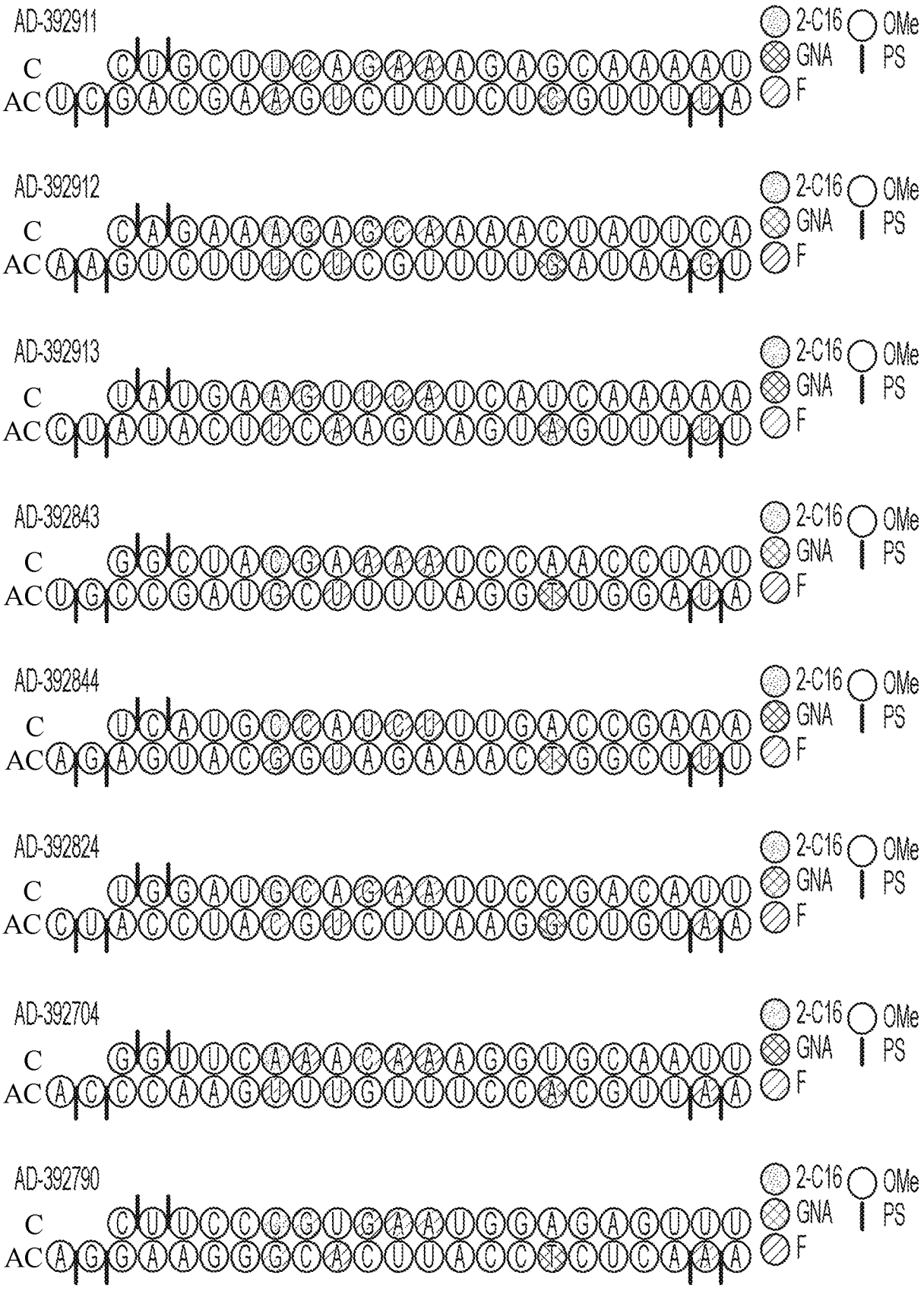
165. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 160-164, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит от одного до четырех 2′-C-алкил-модифицированных нуклеотида, необязательно где 2′-C-алкил-модифицированный нуклеотид представляет собой 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно где средство для RNAi содержит один 2′-C16-модифицированный нуклеотид, необязательно один 2′-C16-модифицированный нуклеотид расположен на смысловой нити в положении шестого нуклеинового основания от 5′-конца смысловой нити или в положении концевого нуклеинового основания 5′-конца.

166. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 160-165, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида, необязательно где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит два или более 2′-фтор-модифицированных нуклеотида,

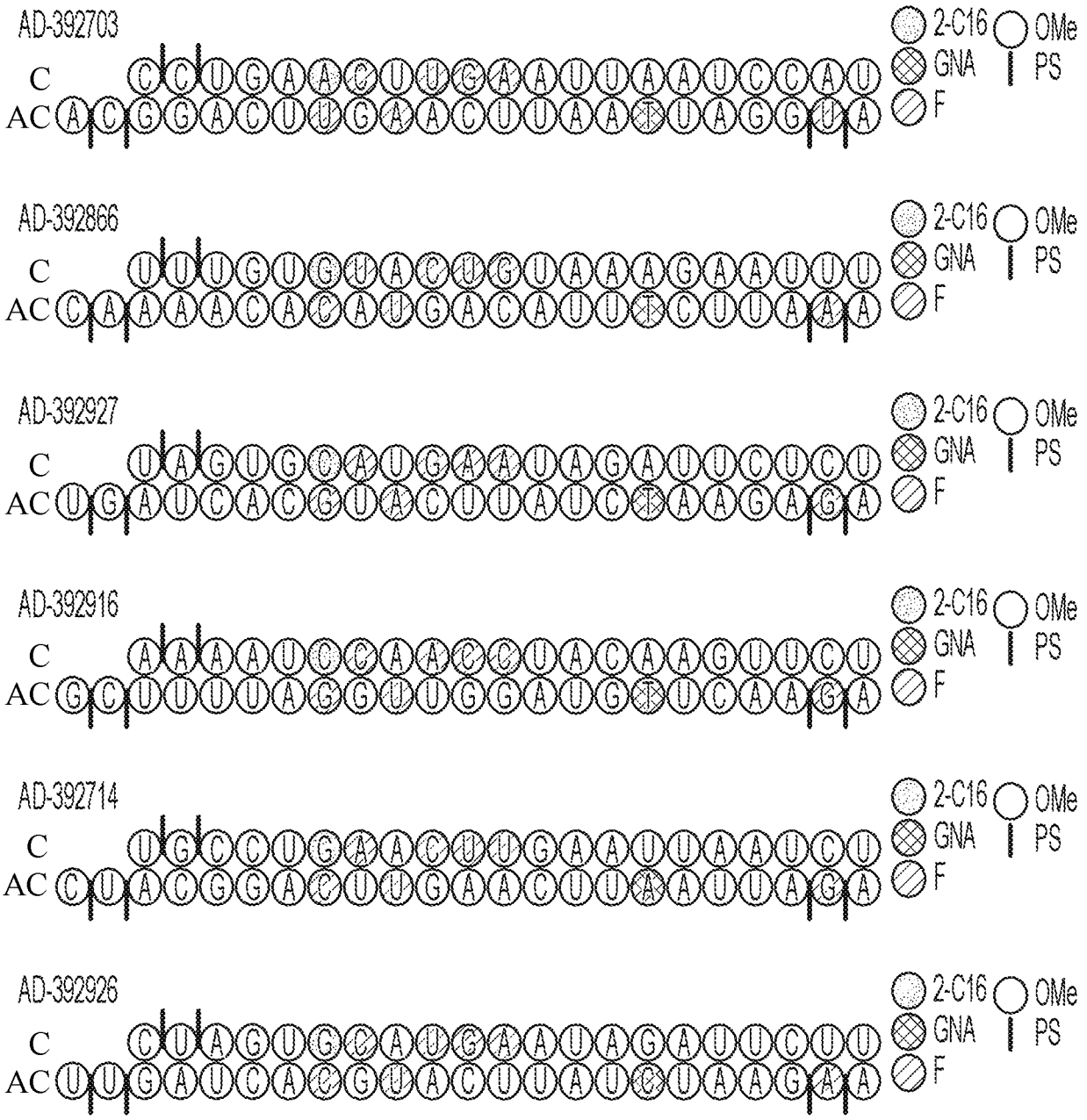
необязательно где 2′-фтор-модифицированные нуклеотиды расположены на смысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 7, 9, 10 и 11 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях нуклеиновых оснований 2, 14 и 16 от 5′-конца антисмысловой нити.

167. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 160-166, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит одну или более VP-модификаций, необязательно где средство для RNAi содержит одну VP-модификацию на 5′-конце антисмысловой нити.

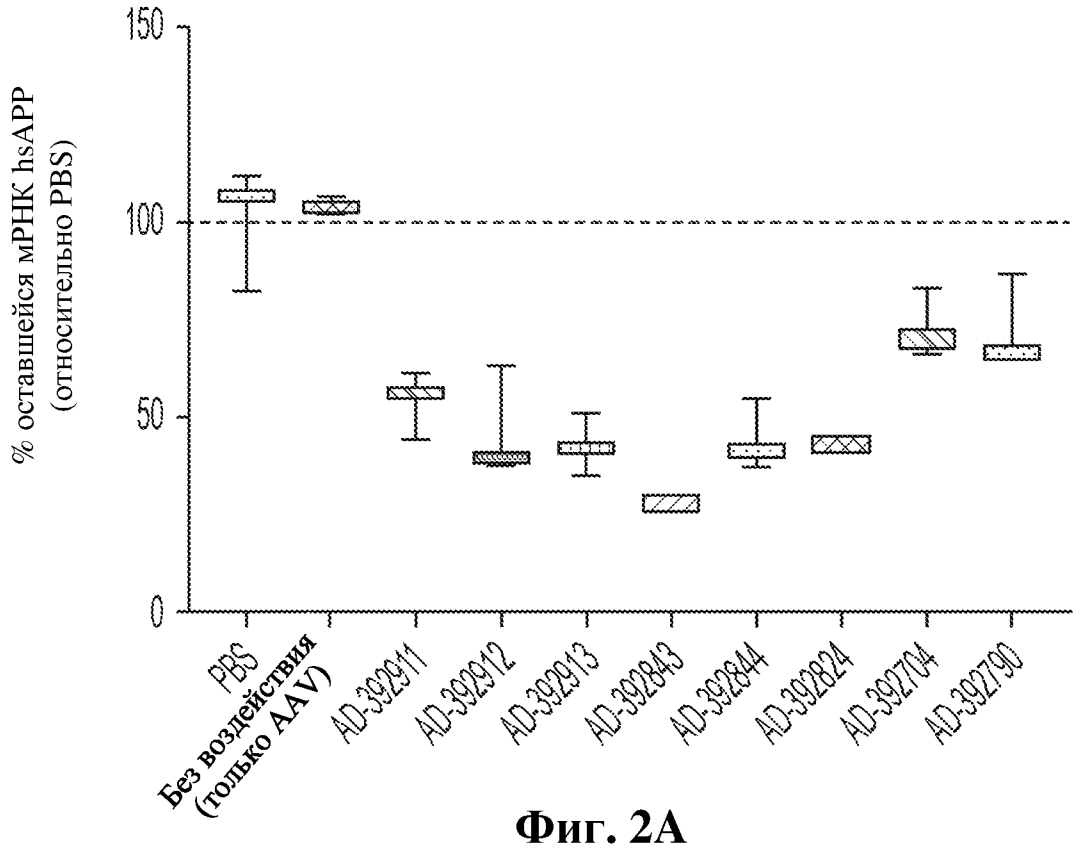
168. Двухнитевое средство для RNAi по любому из пп. 160-167, где каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит 5′-конец и 3′-конец, и где средство для RNAi содержит два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида, необязательно где средство для RNAi содержит 2′-O-метил-модифицированные нуклеотиды во всех положениях нуклеиновых оснований, не модифицированных 2′-фтором, 2′-C-алкилом или гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), необязательно где два или более 2′-O-метил-модифицированных нуклеотида расположены на смысловой нити в положениях 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 от 5′-конца смысловой нити и на антисмысловой нити в положениях 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22 и 23 от 5′-конца антисмысловой нити.


AD-392911
AD-392912
AD-392913
AD-392843
AD-392844
AD-392824
AD-392704
AD-392790
2-C16
OMe
GNA
PS
F

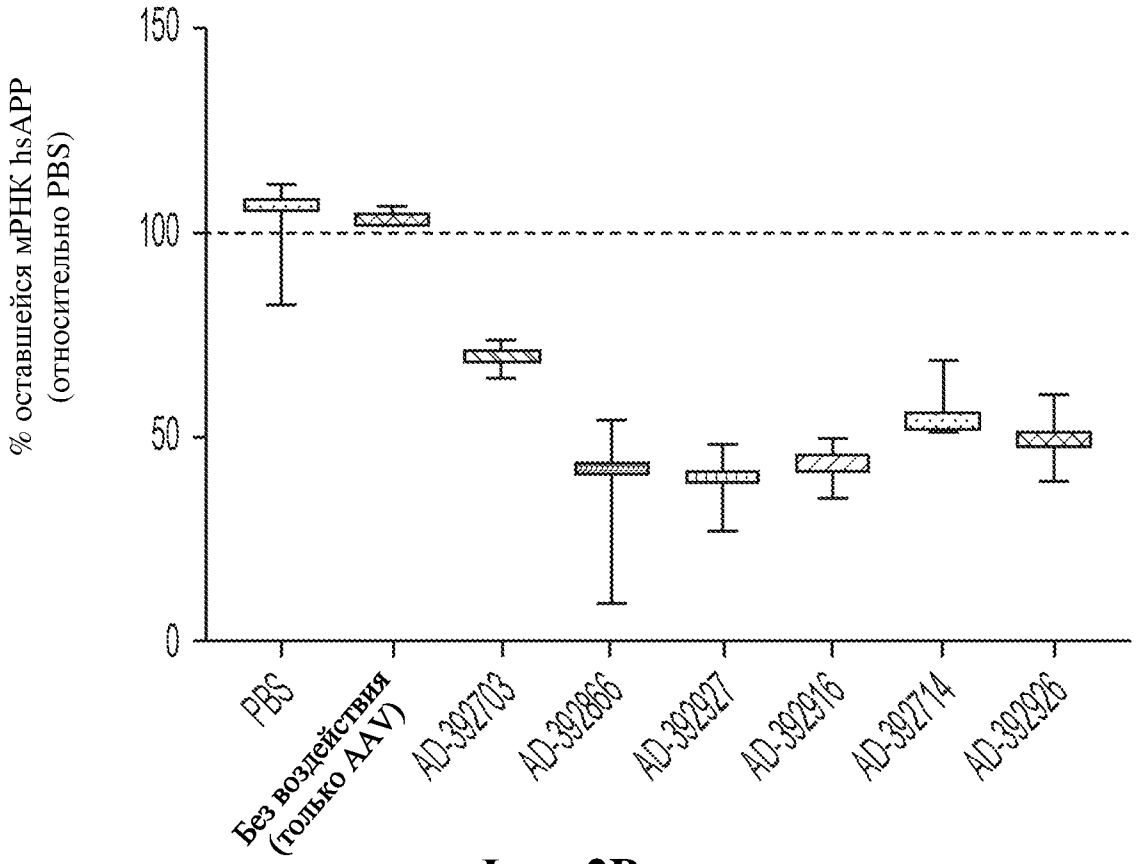
Фиг. 1A


AD-392703
C
AC
AD-392866
C
AC
AD-392927
C
AC
AD-392916
C
AC
AD-392714
C
AC
AD-392926
C
AC
2-C16
GNA
F
OMe
PS

Фиг. 1B


% оставшейся мРНК hsAPP
(относительно PBS)
150
100
50
0
PBS
Без воздействия
(только AAV)
AD-392911
AD-392912
AD-392913
AD-392843
AD-392844
AD-392824
AD-392704
AD-392790

Фиг. 2A

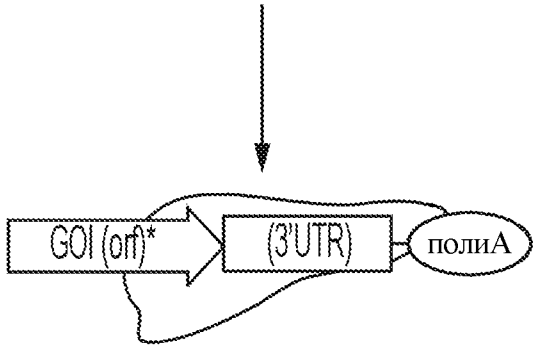


Фиг. 2B

Стратегия идентификации лидерных средств против hCAA

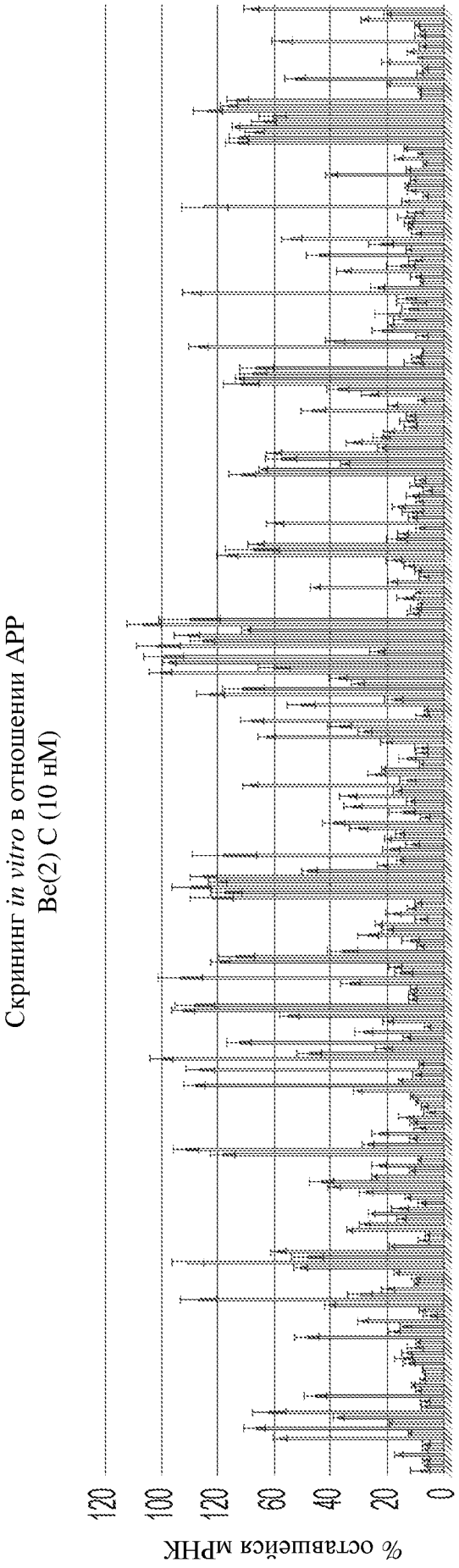
- 300+ siRNA подвергли скринингу *in vitro* путем трансфекции

- Скрининг *in vivo* в печени мышей, которым трансдуцировали AAV-hAPP

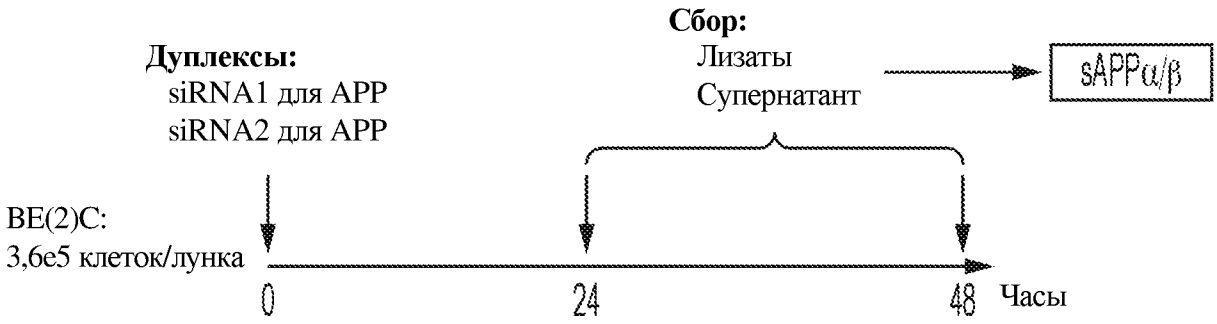


- Преобразование дуплексов в конъюгаты для ЦНС и проведение исследований по поиску лидерных средств *in vivo* на NHP

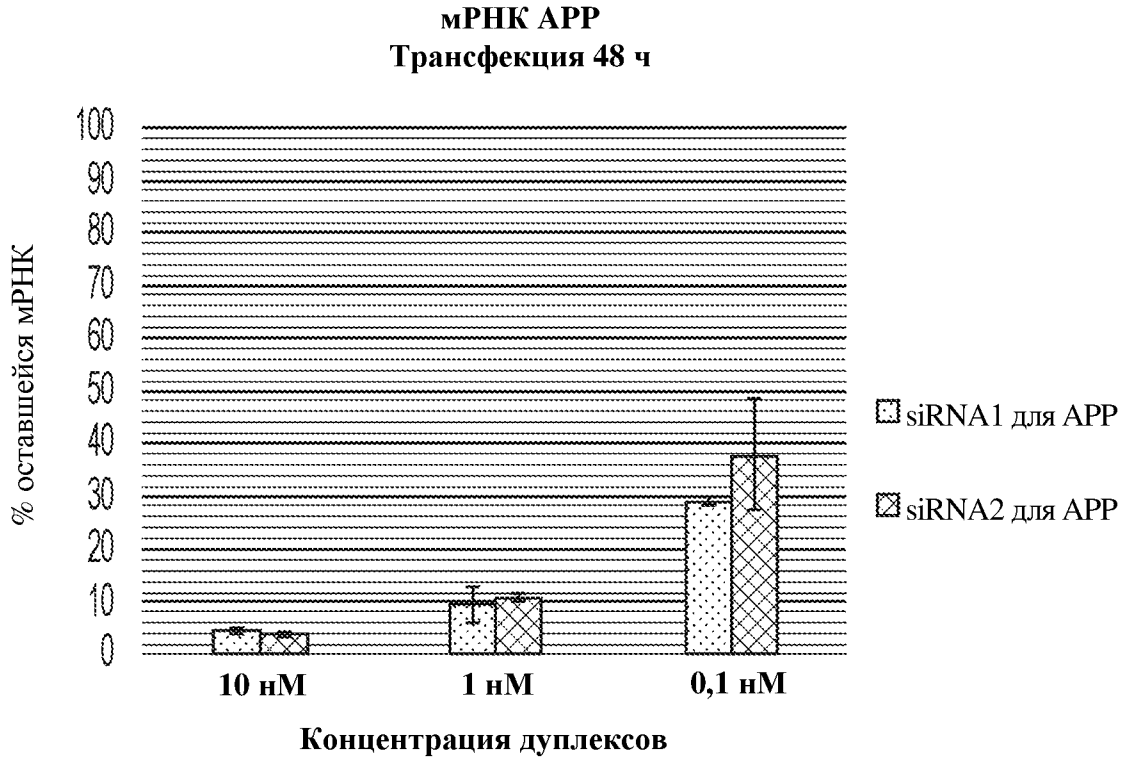
Фиг. 3A


Скрининг *in vitro* в отношении APP
Be(2) C (10 нМ)
% оставшейся мРНК
120
100
120
60
40
20
0

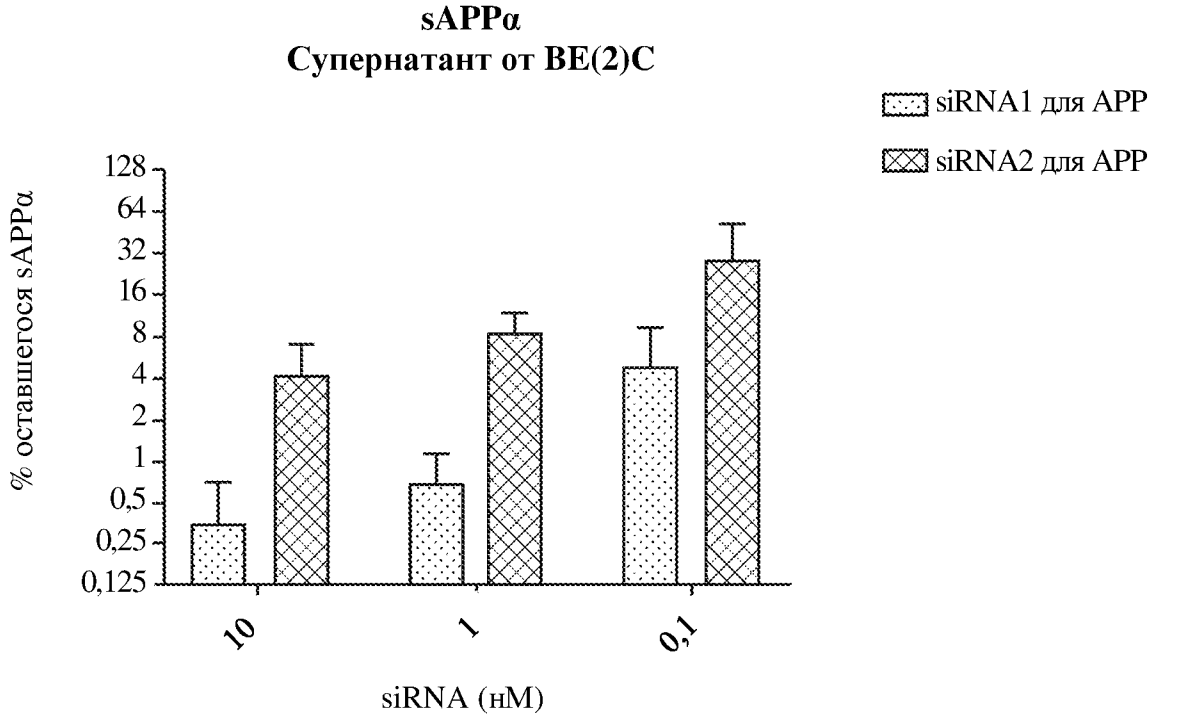
Фиг. 3B

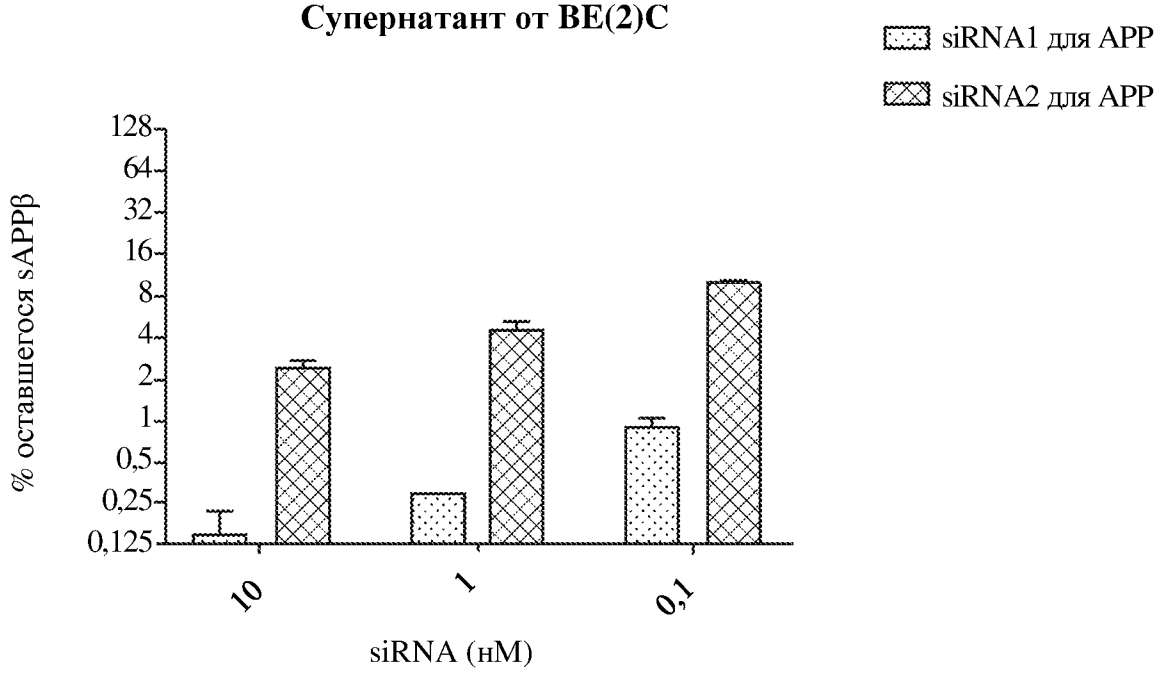

Дуплексы:
siRNA1 для APP
siRNA2 для APP
Сбор:
Лизаты
Супернатант
sAPPα/β
BE(2)C:
3,6e5 клеток/лунка
0
24
48
Часы

Фиг. 4A


мРНК APP
Трансфекция 48 ч
% оставшейся мРНК
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10 нМ
1 нМ
0,1 нМ
Концентрация дуплексов
siRNA1 для APP
siRNA2 для APP

Фиг. 4B

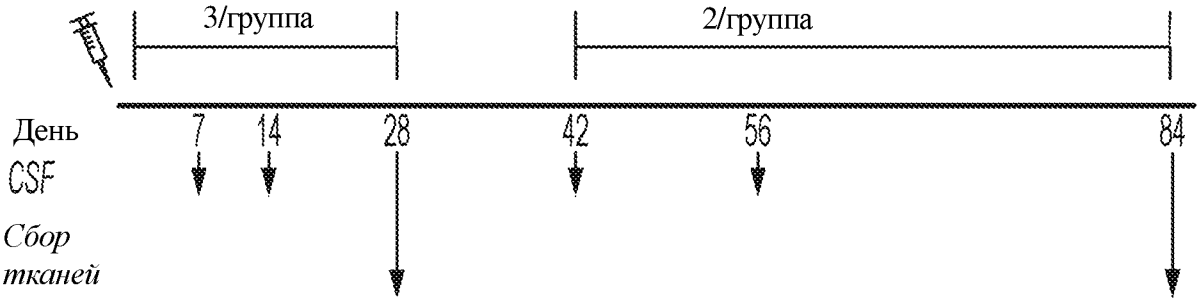

sAPPα
Супернатант от BE(2)C
siRNA1 для APP
siRNA2 для APP
% оставшегося sAPPα
128
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
10
1
0,1
siRNA (нМ)


sAPPβ
Супернатант от BE(2)C
siRNA1 для APP
siRNA2 для APP
% оставшегося sAPPβ
128
64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
10
1
0,1
siRNA (нМ)

Фиг. 4C

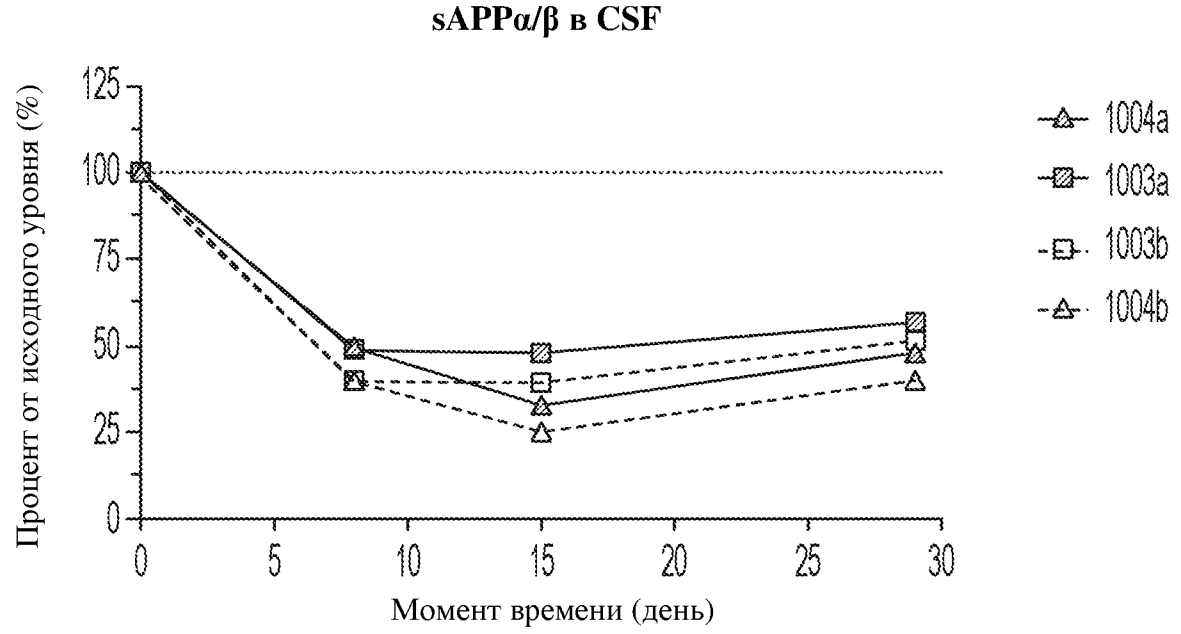
Однократное IT введение в дозе 72 мг

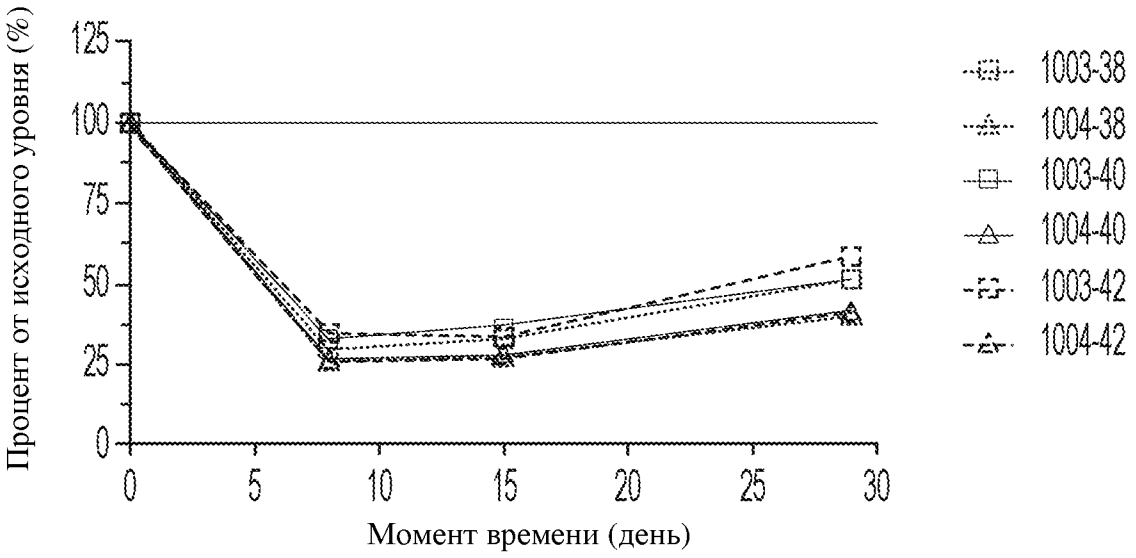
- **5 соединений, 5 животных/группа**



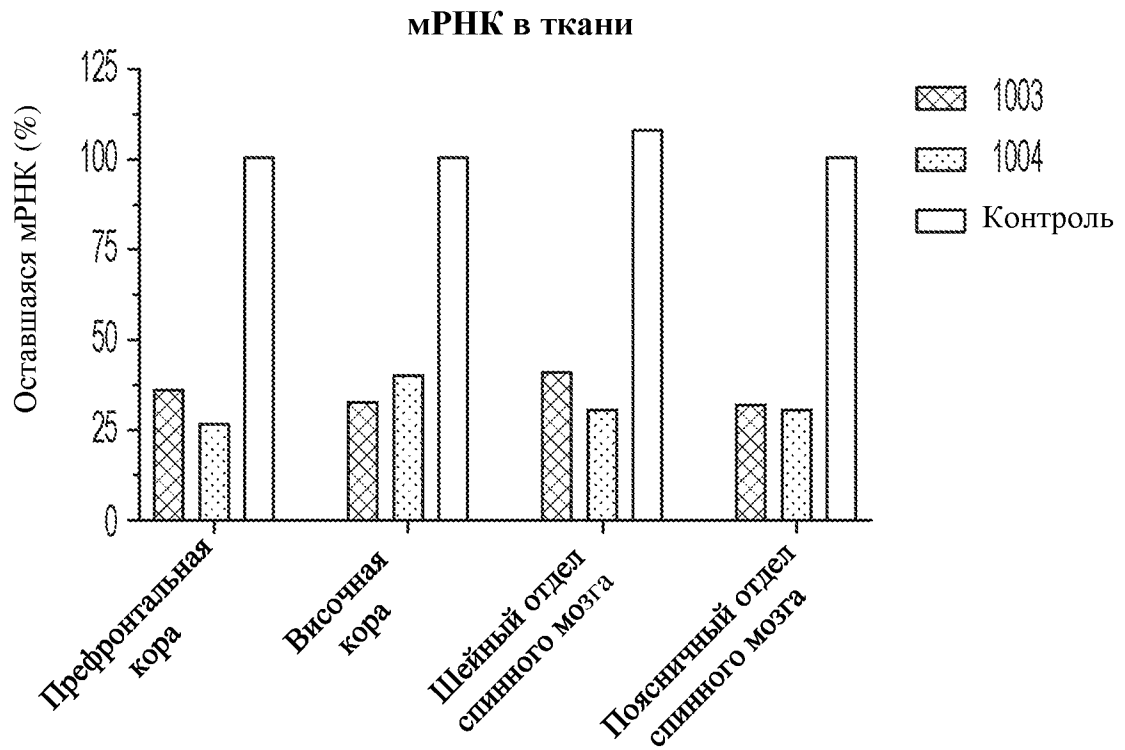
Ткани: ***Спинной мозг:*** поясничный, грудной и шейный отделы
Головной мозг: префронтальная кора, височная кора, мозжечок, ствол головного мозга, гиппокамп, полосатое тело
Жидкости: CFS и плазма крови
Анализы: содержание мРНК, уровни siRNA в ткани, siRNA, загруженные в RISC

Фиг. 5A

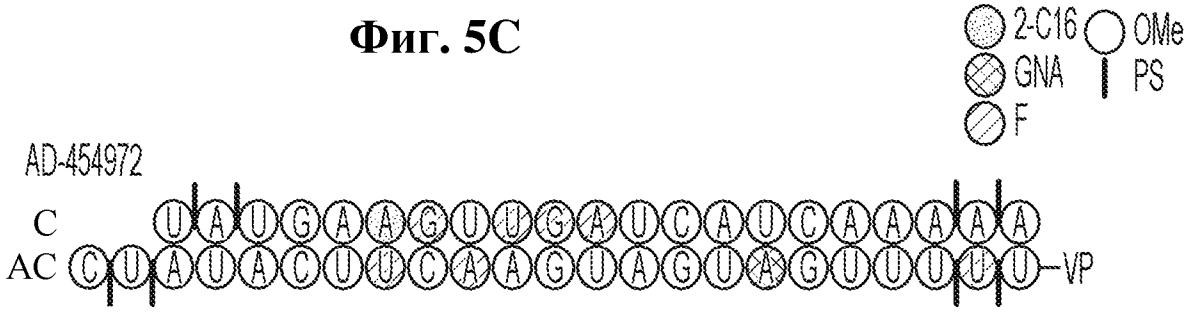

sAPPα/β в CSF
Процент от исходного уровня (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
Момент времени (день)
1004a
1003a
1003b
1004b


Разновидности
бета-амилоида в CSF
AD-454972
Процент от исходного уровня (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
Момент времени (день)
1003-38
1004-38
1003-40
1004-40
1003-42
1004-42

Фиг. 5B



Фиг. 5C

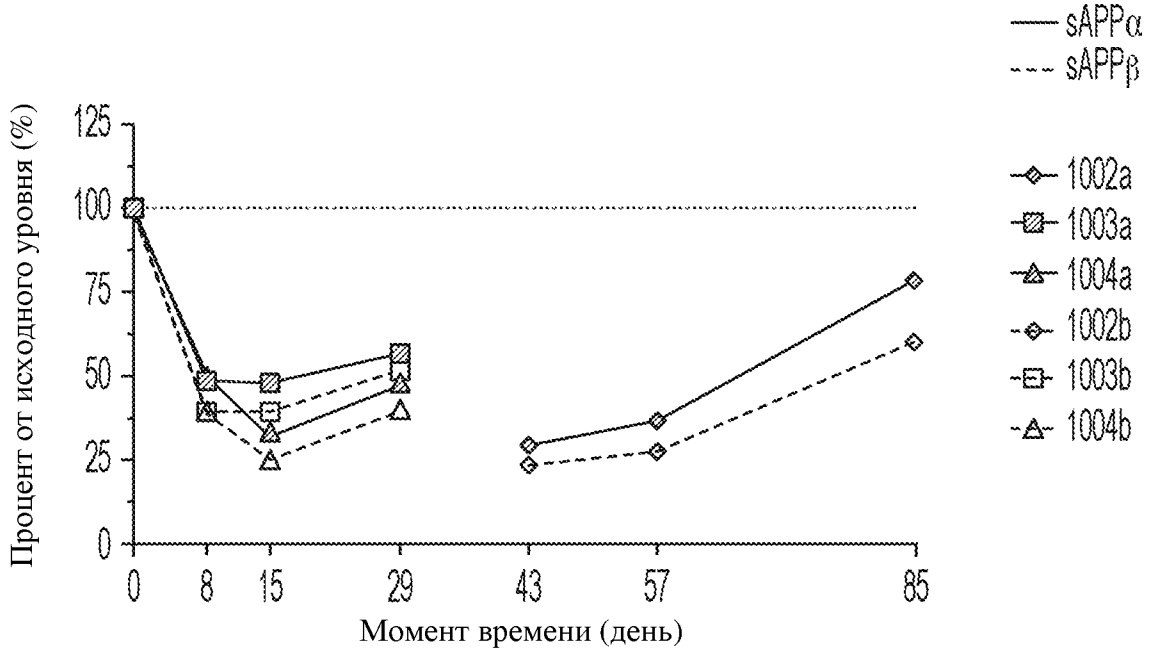


siRNA в ткани

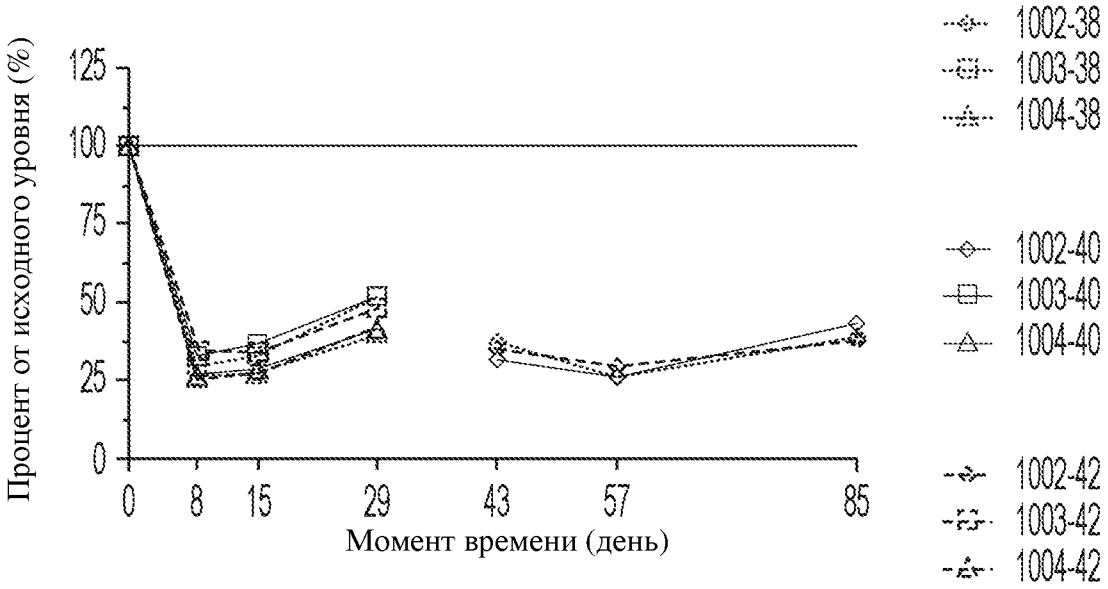
ID животного	Материал	Конечное содержание дуплекса (нг/г)
1003	Поясничный отдел спинного мозга	13695
1004		12096
1003	Шейный отдел спинного мозга	7154
1004		7826
1003	Префронтальная кора	6413
1004		5163
1003	Височная кора	5115
1004		2660

Фиг. 5D

sAPPα/β в CSF
AD-454972

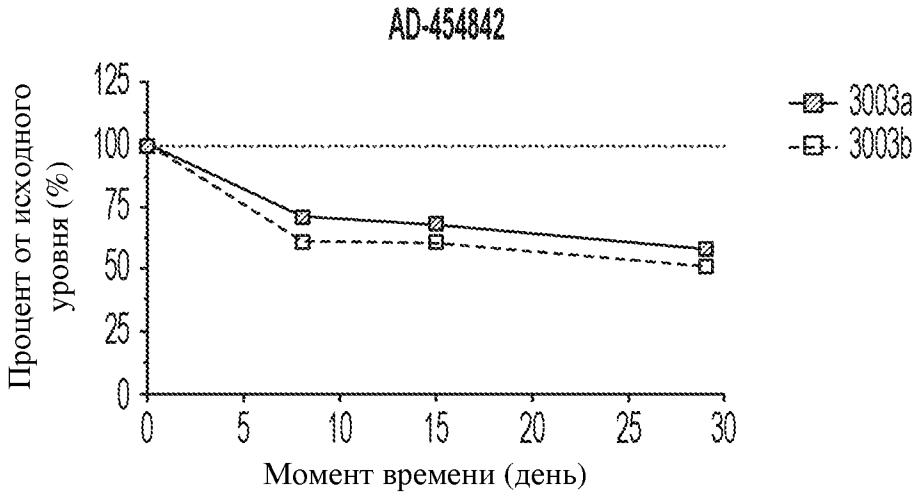


Разновидности
бета-амилоида в CSF
AD-454972

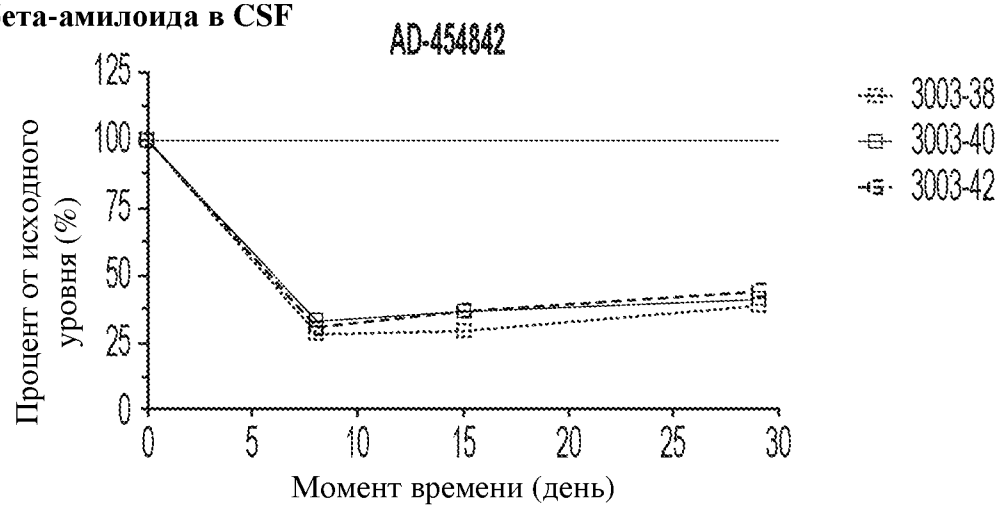


Фиг. 6

sAPPα/β в CSF



Разновидности бета-амилоида в CSF



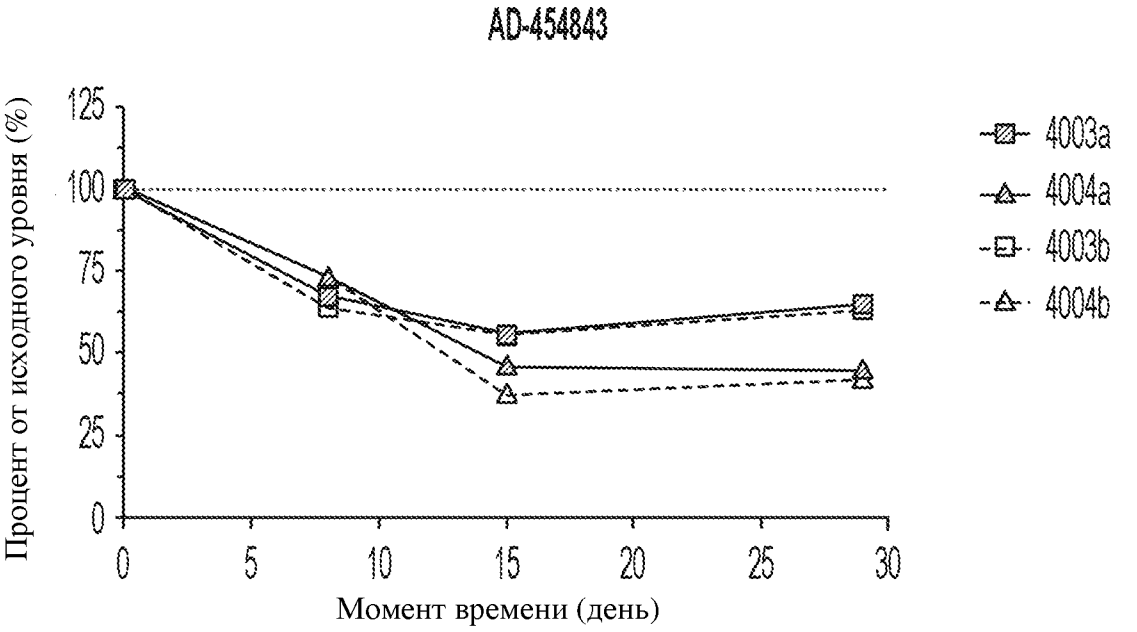
Фиг. 7A

siRNA в ткани

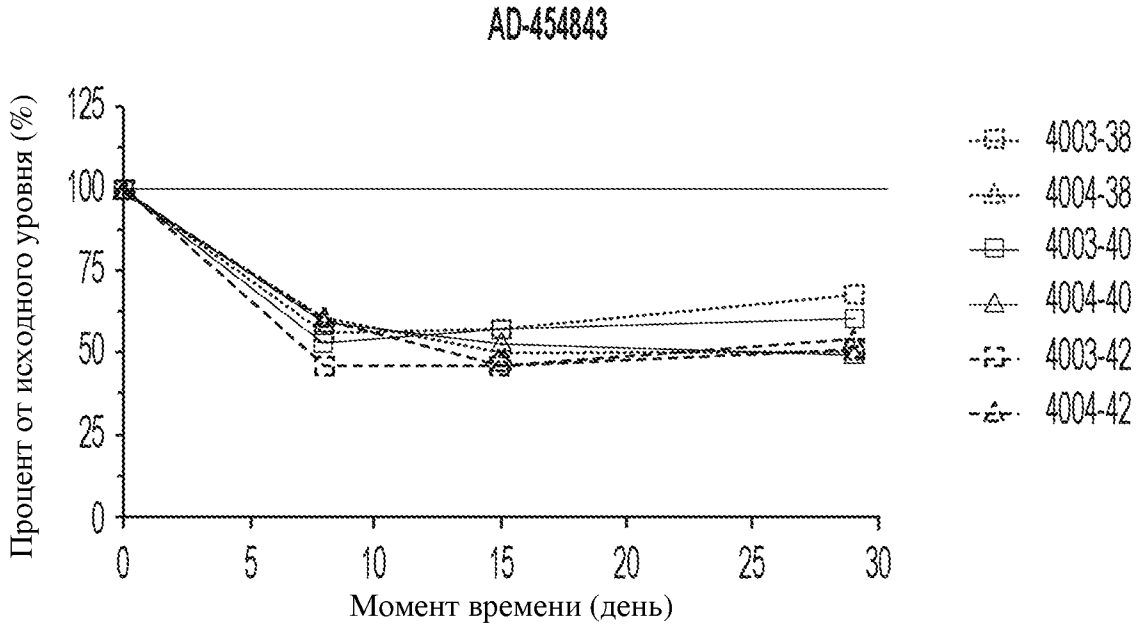
ID животного	Материал	Конечное содержание дуплекса (нг/г)
3003	Поясничный отдел спинного мозга	30410
3003	Шейный отдел спинного мозга	7839
3003	Префронтальная кора	14631
3003	Височная кора	10408

Фиг. 7B

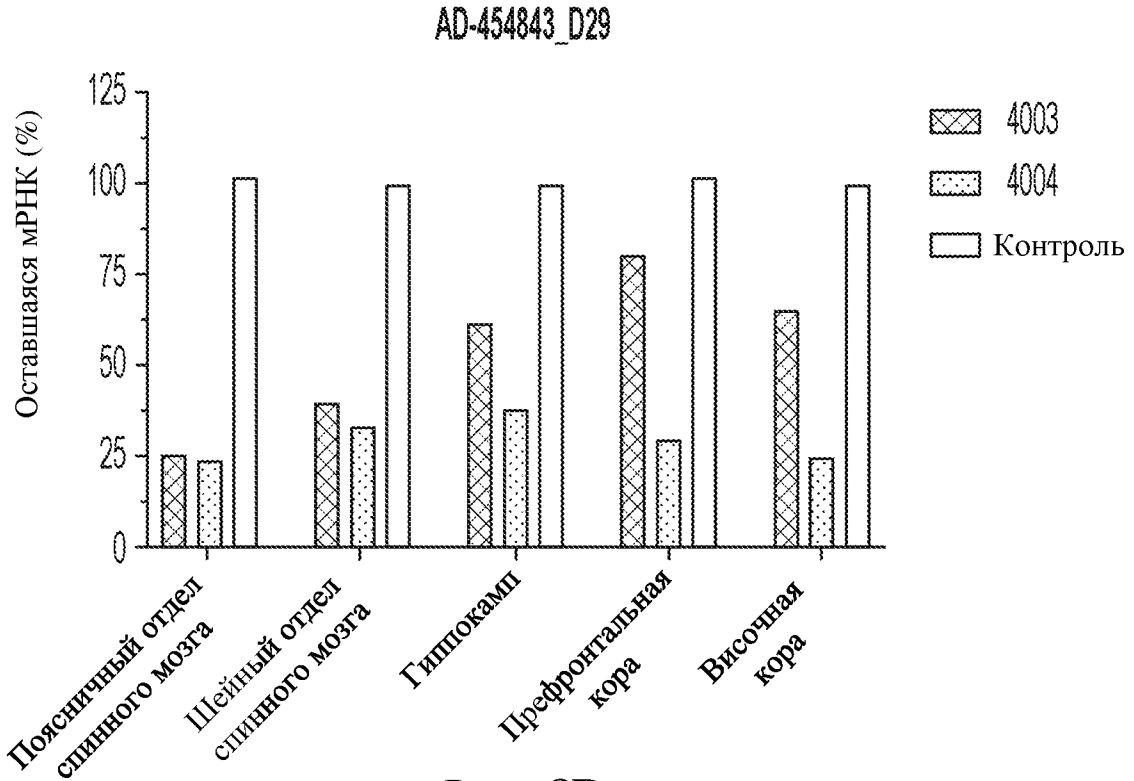
sAPPα/β в CSF



Разновидности бета-амилоида в CSF



Фиг. 8A



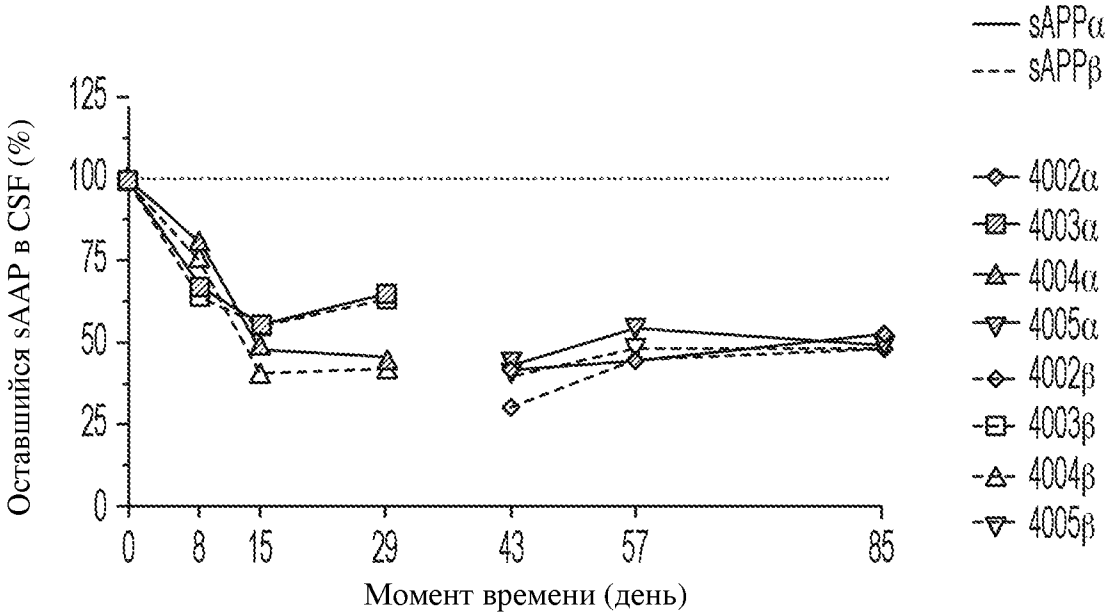
Фиг. 8B

siRNA в ткани

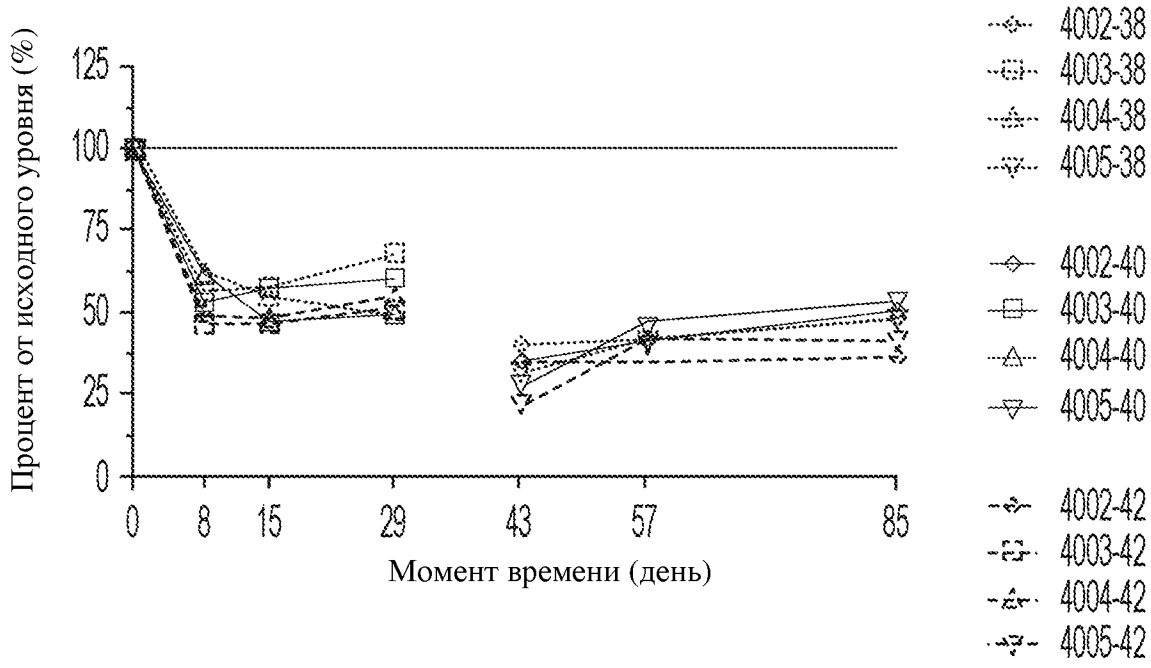
ID животного	Материал	Конечное содержание дуплекса (нг/г)
4003	Поясничный отдел спинного мозга	8278
4004		9686
4003	Шейный отдел спинного мозга	4906
4004		3408
4003	Префронтальная кора	1910
4004		6233
4003	Височная кора	950
4004		6384

Фиг. 8C

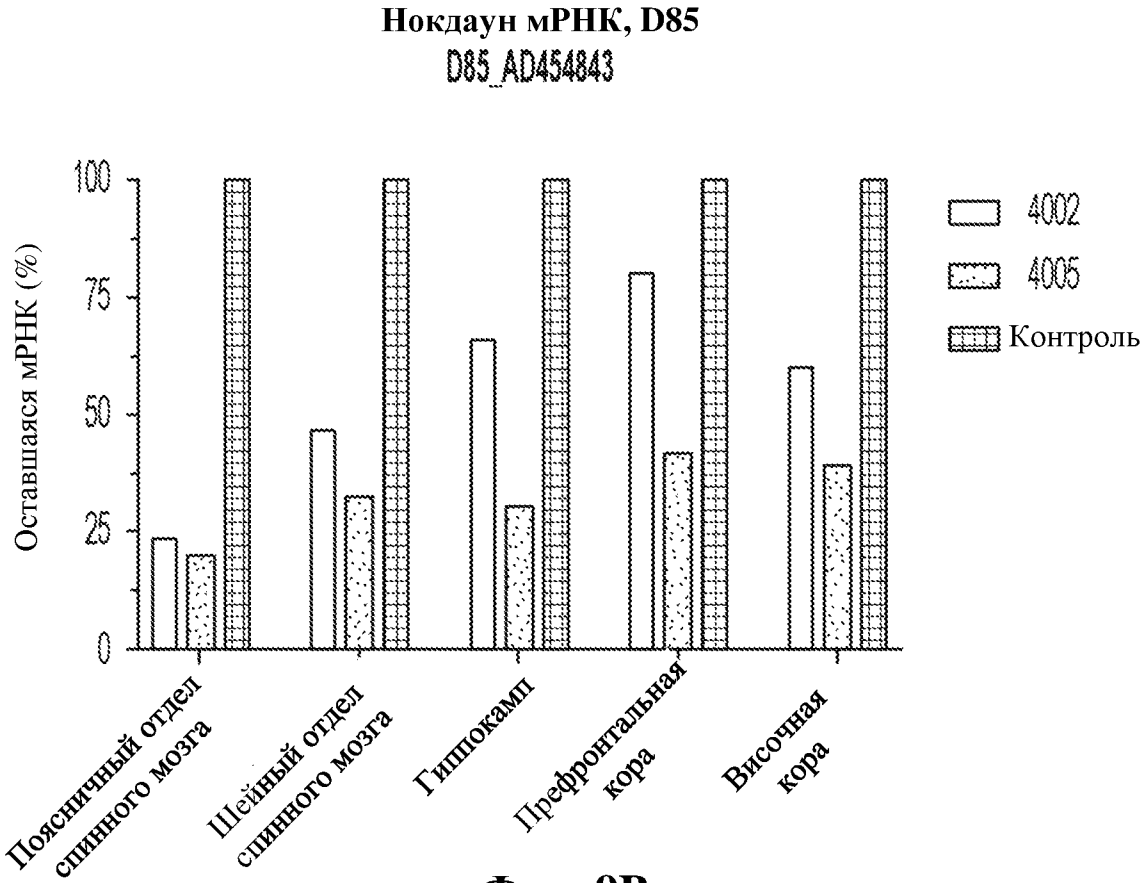
sAPPα/β в CSF
AD-454843



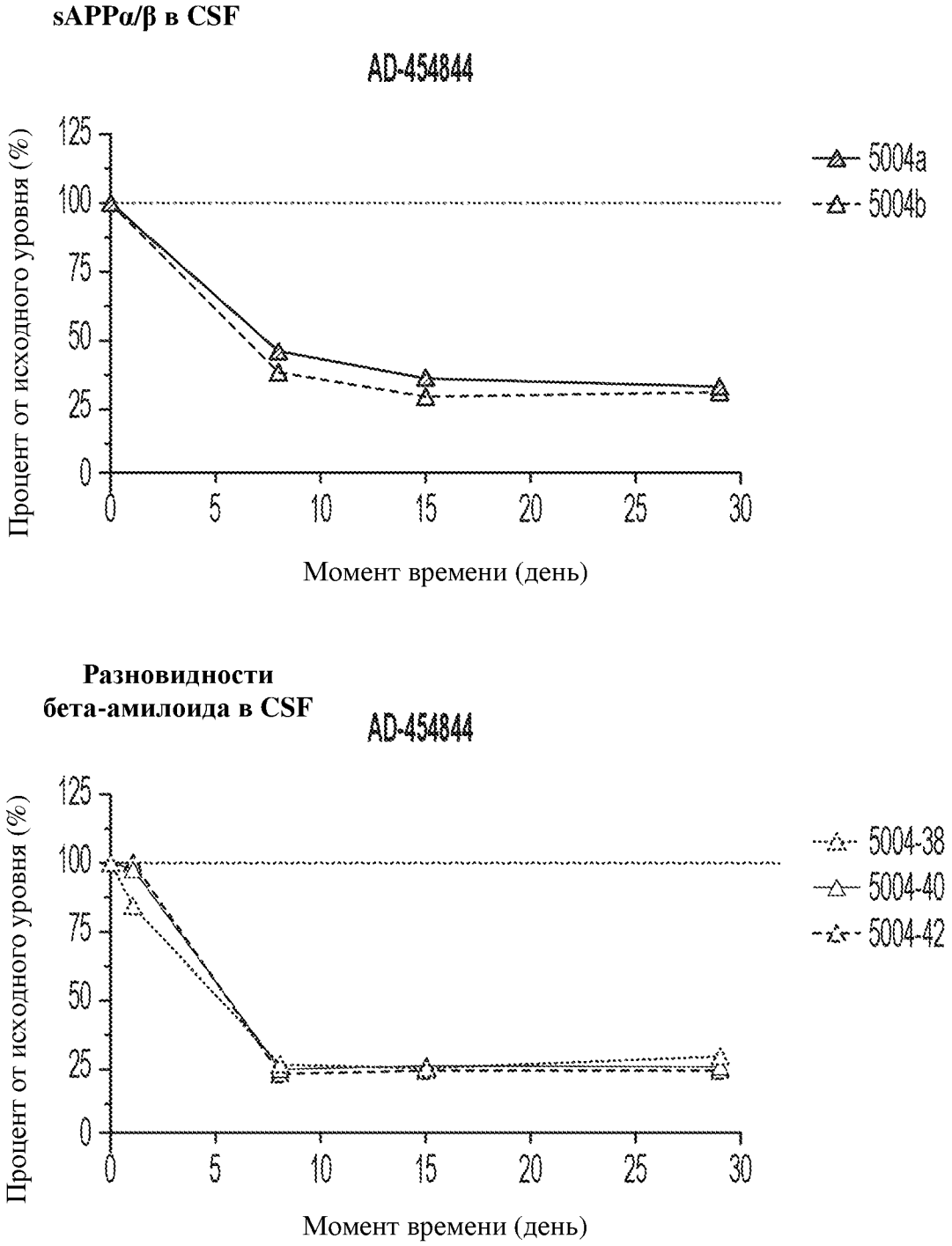
Разновидности
бета-амилоида в CSF
AD-454843



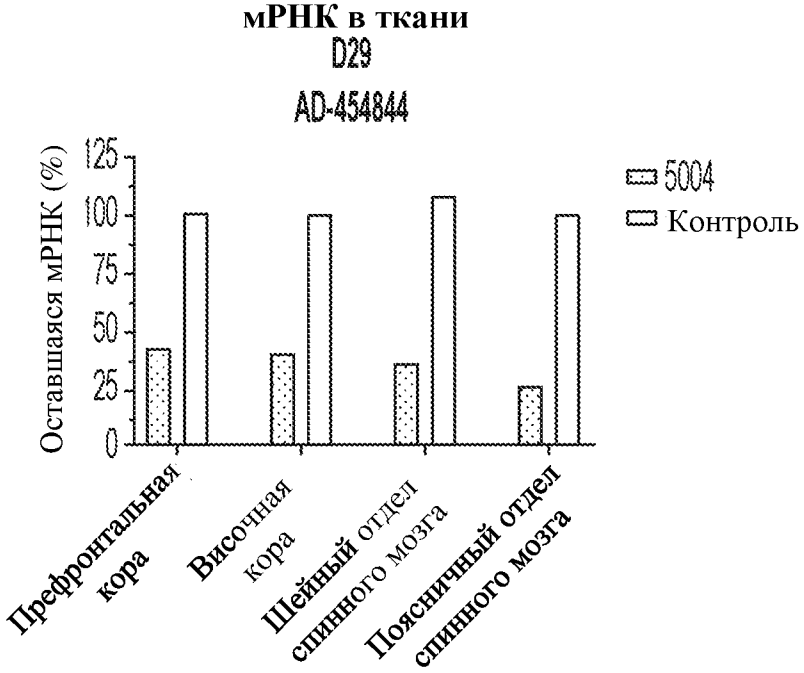
Фиг. 9A


Нокдаун мРНК, D85
D85_AD454843
Оставшаяся мРНК (%)
100
75
50
25
0
4002
4005
Контроль
Поясничный отдел спинного мозга
Шейный отдел спинного мозга
Гиппокамп
Префронтальная кора
Височная кора

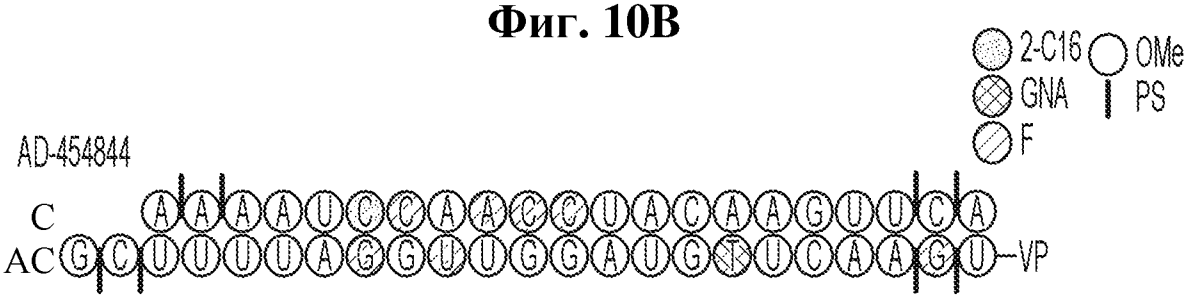
Фиг. 9B


sAPPα/β в CSF
AD-454844
Процент от исходного уровня (%)
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
Момент времени (день)
5004a
5004b
Разновидности бета-амилоида в CSF
AD-454844
Процент от исходного уровня (%)
Момент времени (день)
5004-38
5004-40
5004-42

Фиг. 10A



Фиг. 10B



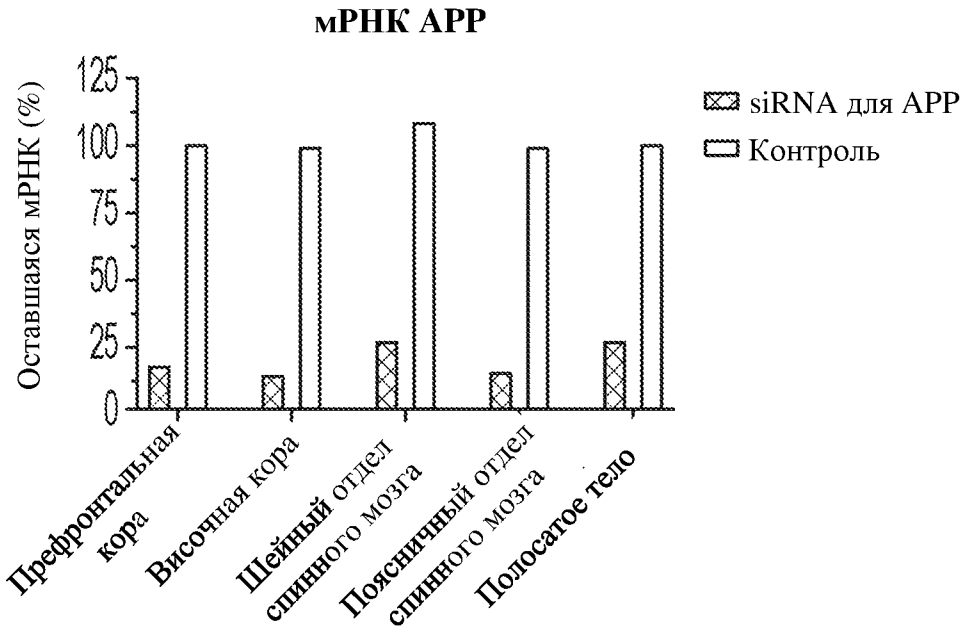
siRNA в ткани

ID животного	Материал	Конечное содержание дуплекса (нг/г)
5004	Поясничный отдел спинного мозга	10138
5004	Шейный отдел спинного мозга	4672
5004	Префронтальная кора	2779
5004	Височная кора	2662

Фиг. 10C

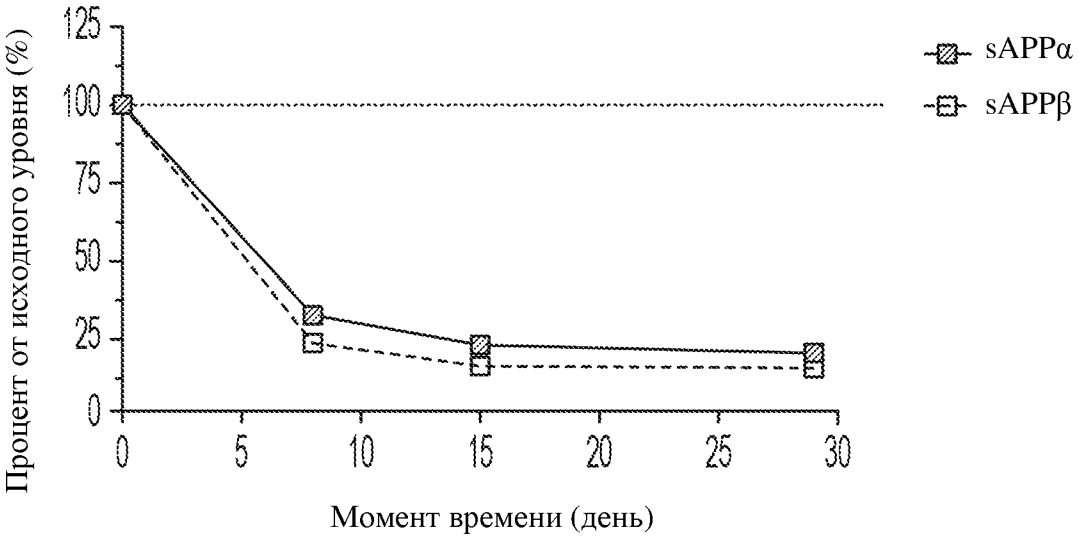
Материал	Конечное содержание дуплекса (мкг/г)
Поясничный отдел спинного мозга	25,6
Шейный отдел спинного мозга	14,9
Префронтальная кора	36,7
Височная кора	29,5

Фиг. 11A

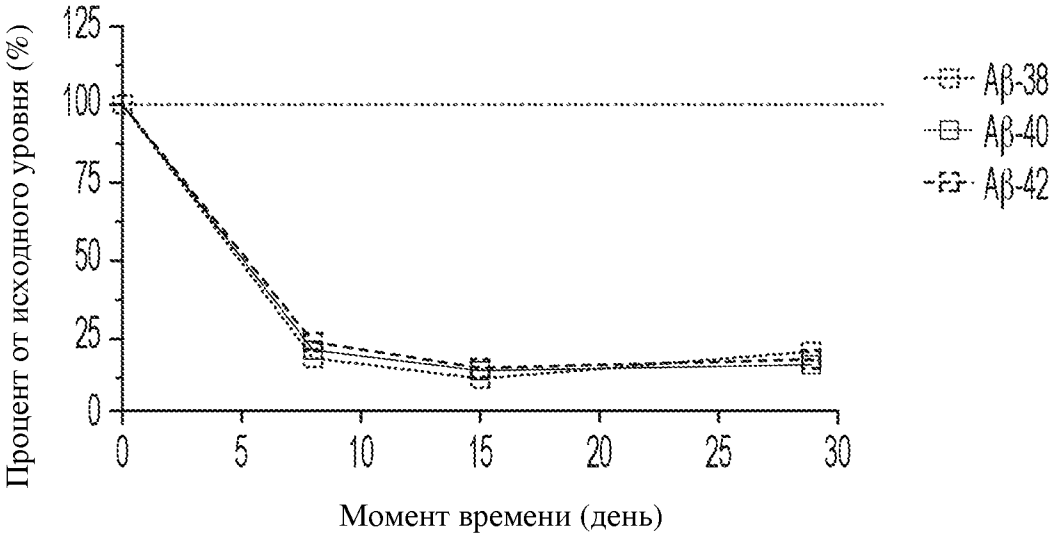


Фиг. 11B

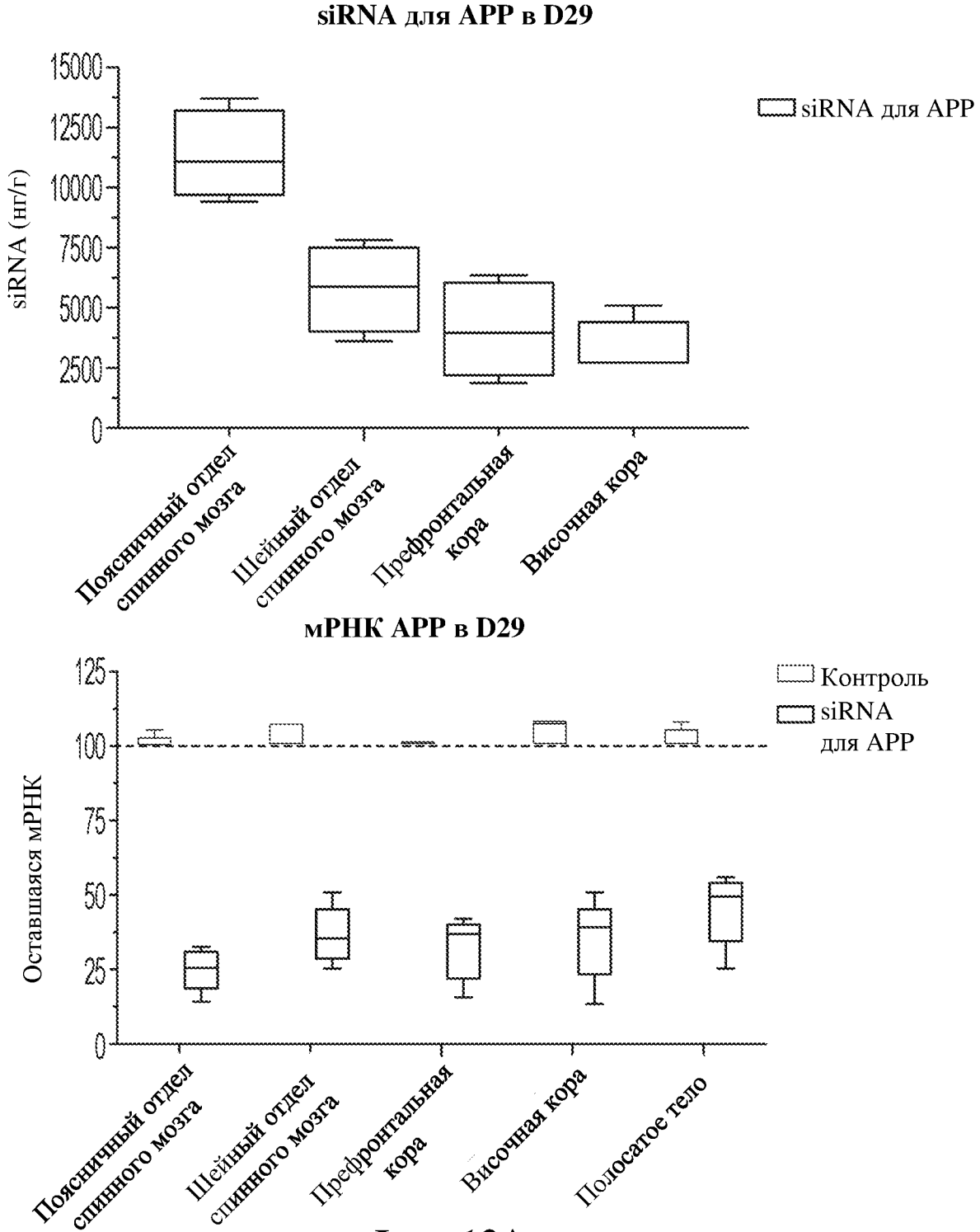
Растворимые APPα и β в CSF



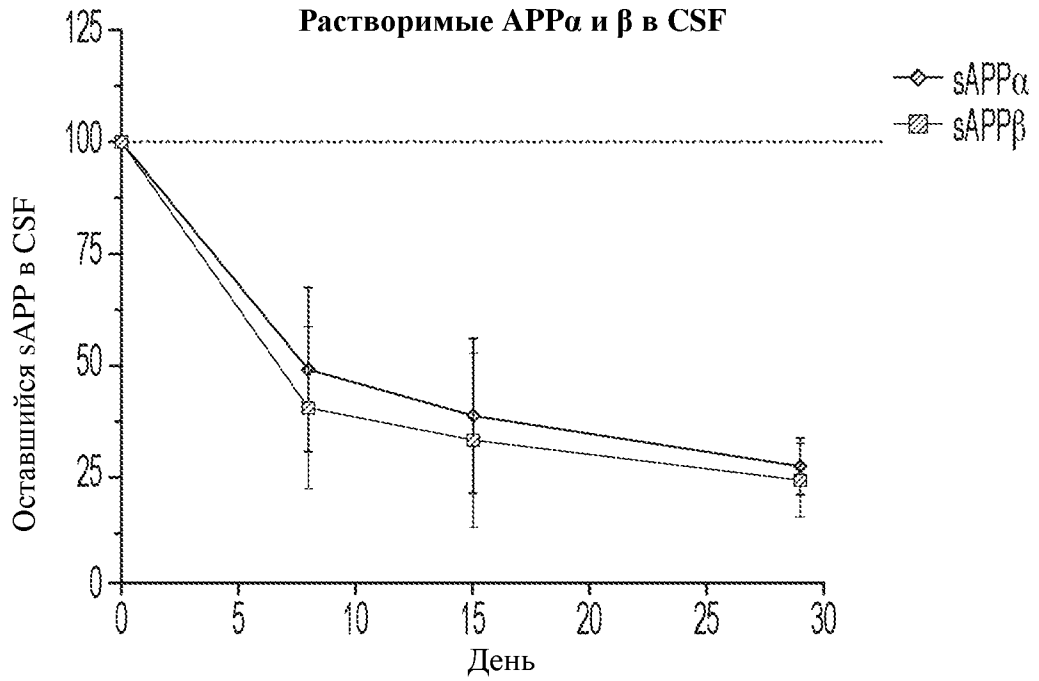
Разновидности бета-амилоида в CSF

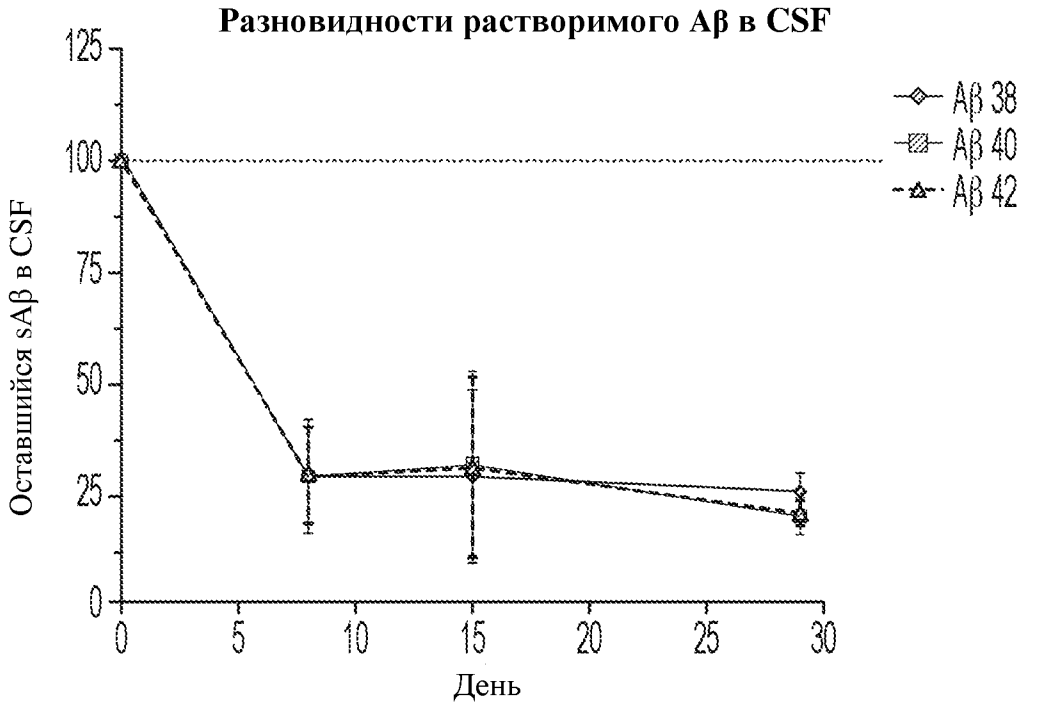


Фиг. 11C

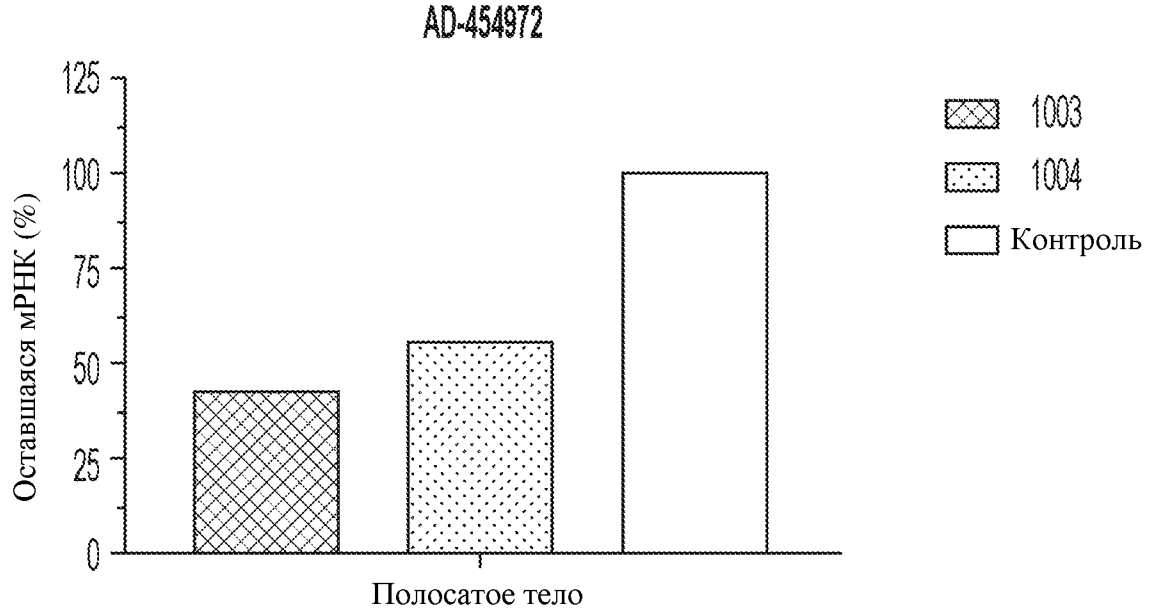

siRNA для APP в D29
siRNA для APP
siRNA (нг/г)
15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
Поясничный отдел спинного мозга
Шейный отдел спинного мозга
Префронтальная кора
Височная кора
мРНК APP в D29
Контроль
siRNA для APP
Оставшаяся мРНК
125
100
75
50
25
0
Поясничный отдел спинного мозга
Шейный отдел спинного мозга
Префронтальная кора
Височная кора
Полосатое тело

Фиг. 12A

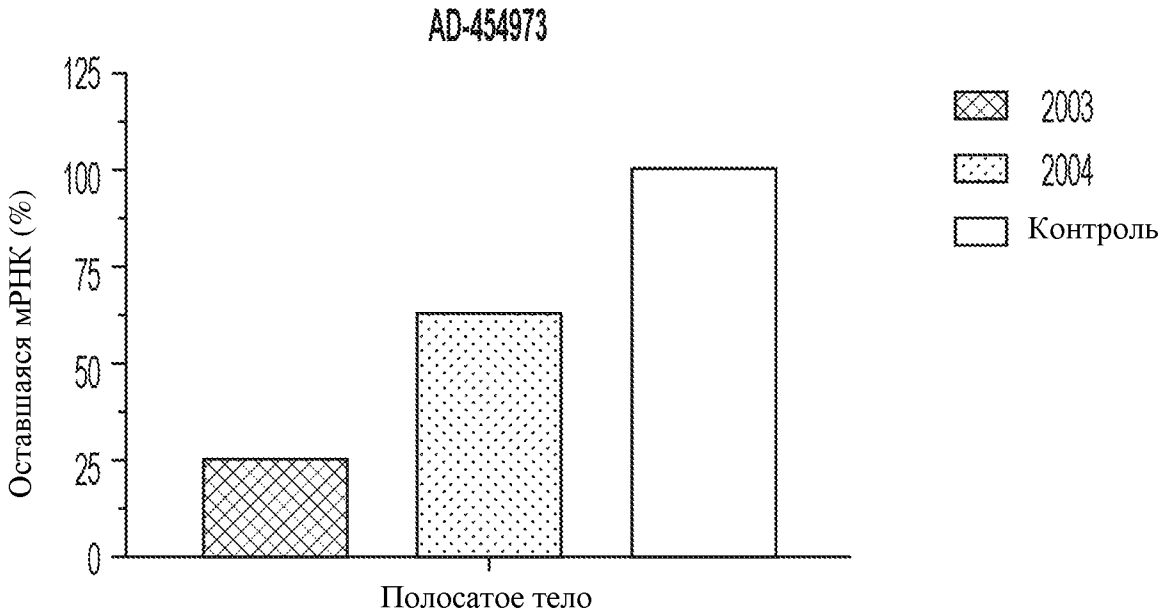

Растворимые APPα и β в CSF
sAPPα
sAPPβ
Оставшийся sAPP в CSF
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
День


Разновидности растворимого Aβ в CSF
Aβ 38
Aβ 40
Aβ 42
Оставшийся sAβ в CSF
125
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
День

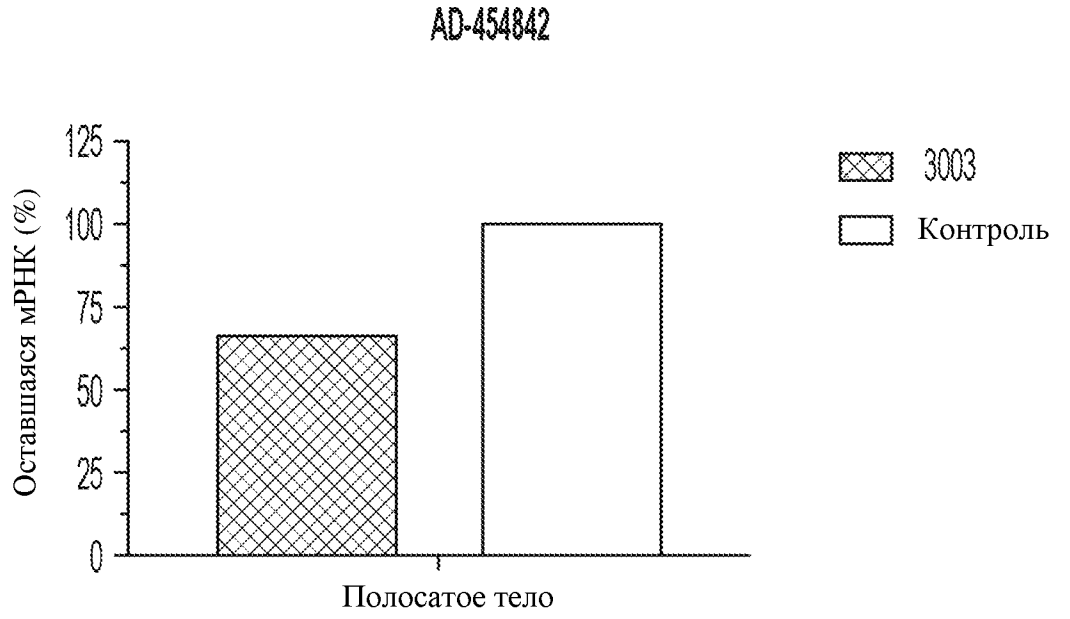
Фиг. 12B



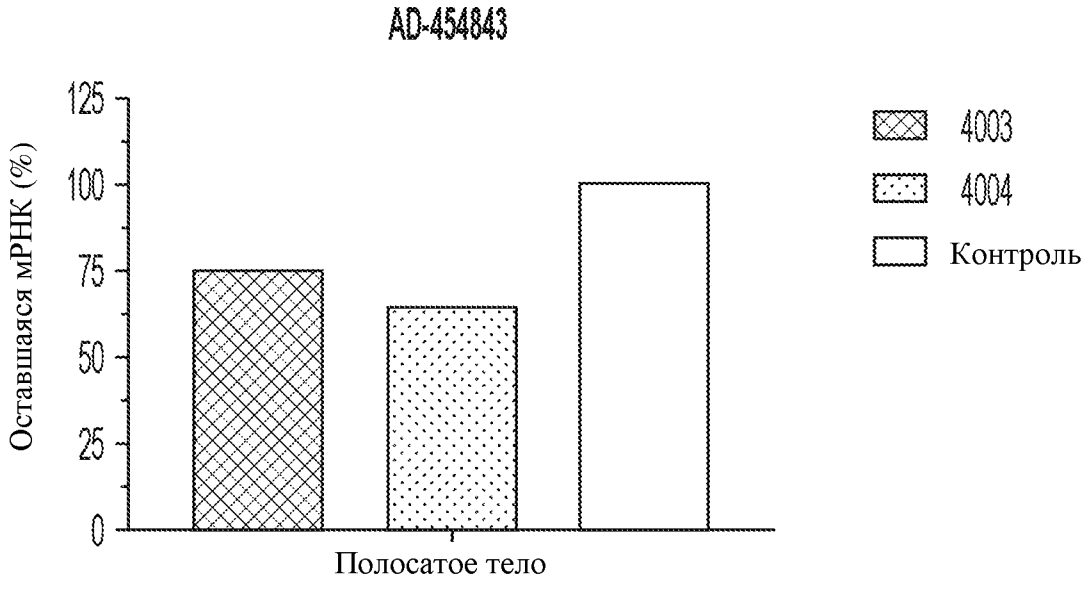
Фиг. 13A



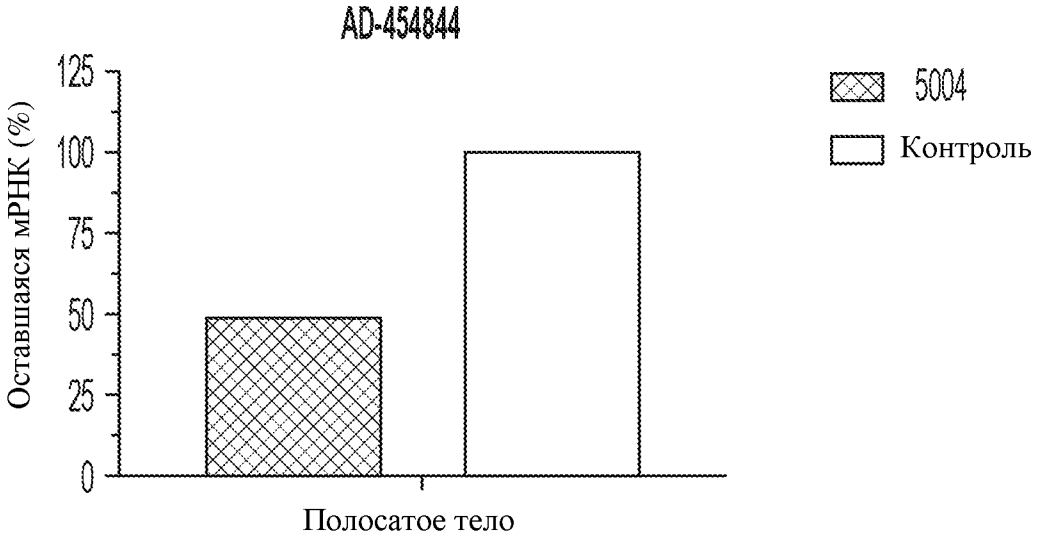
Фиг. 13B



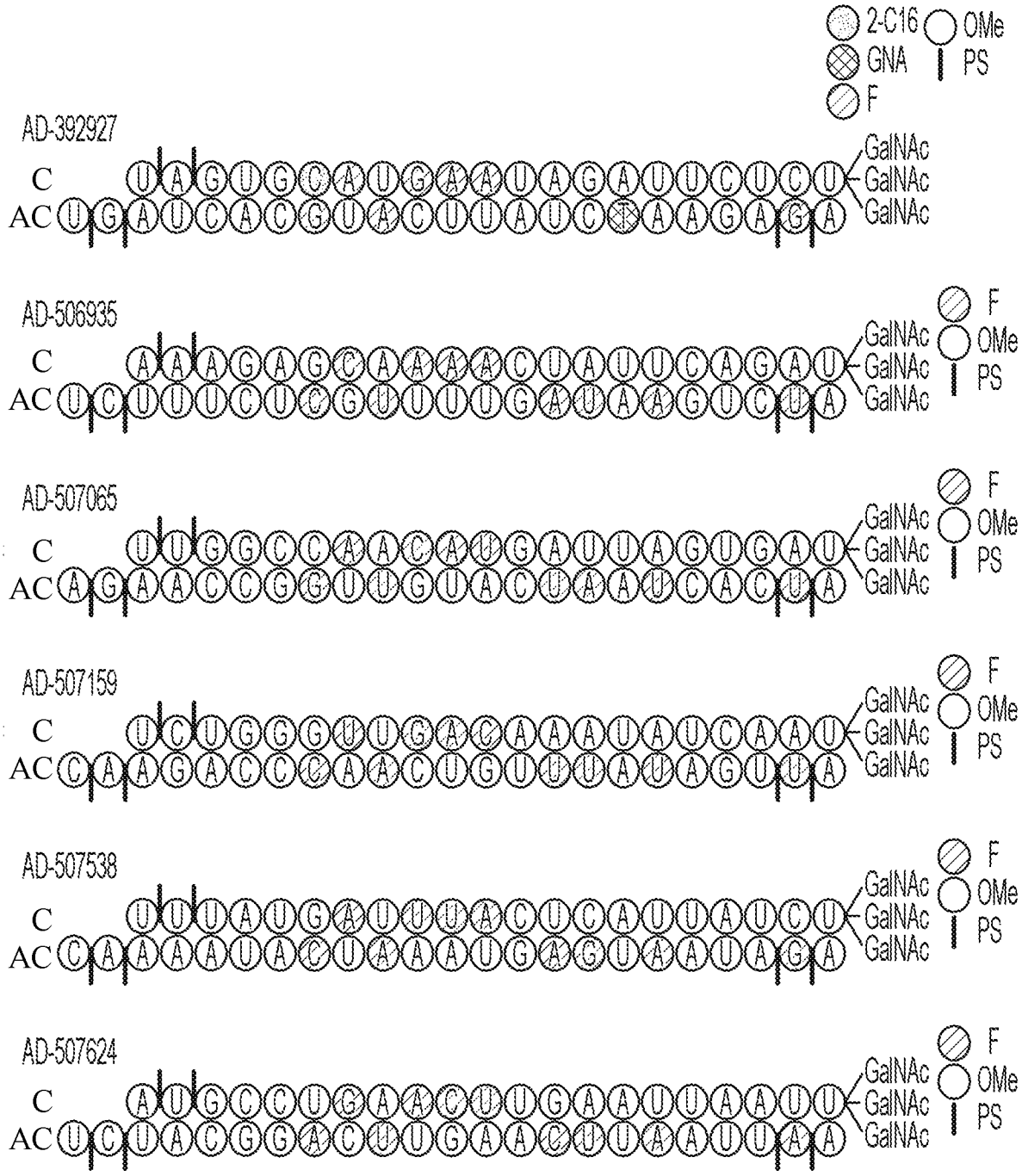
Фиг. 13C



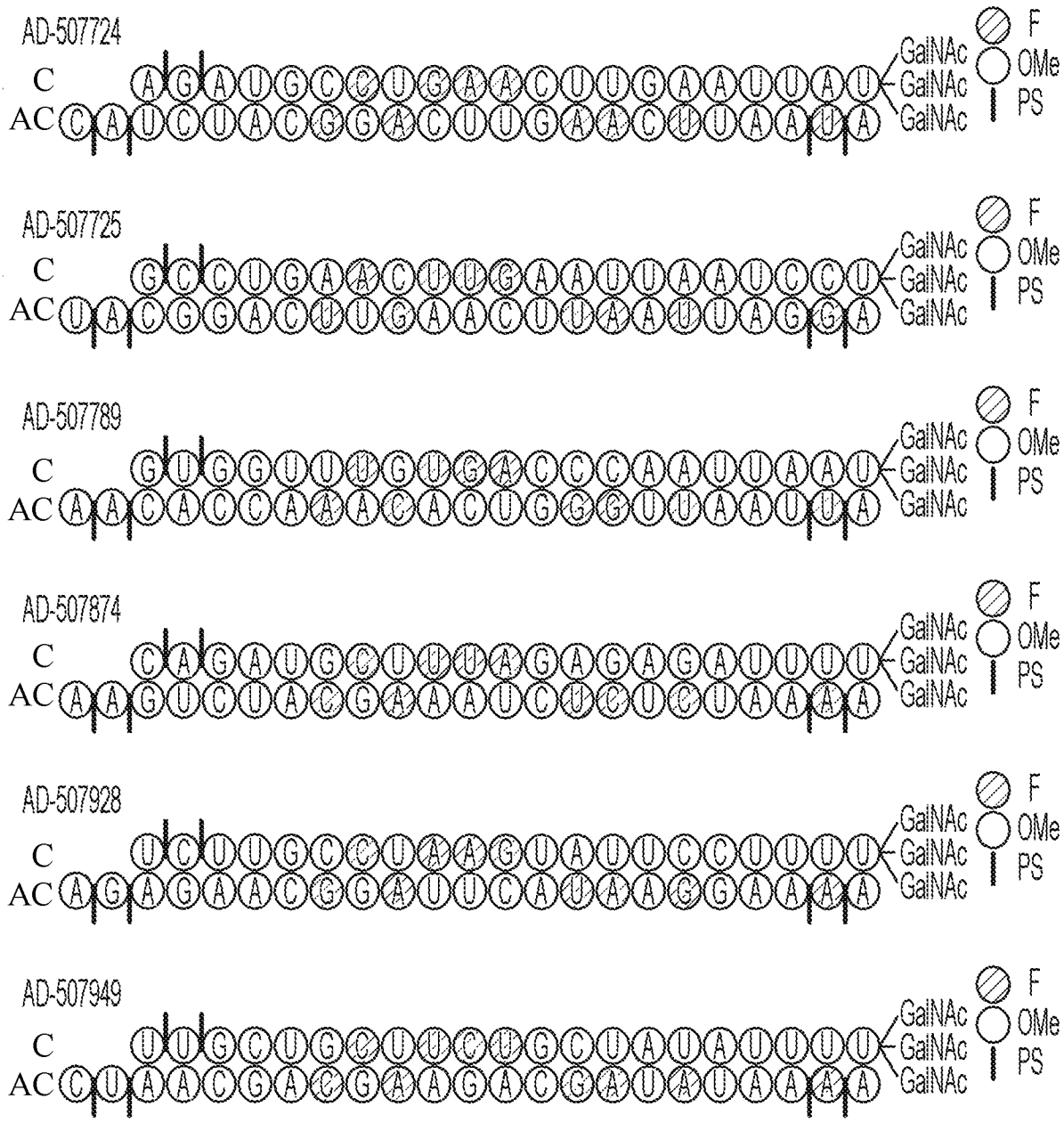
Фиг. 13D


AD-454844
Оставшаяся мРНК (%)
125
100
75
50
25
0
Полосатое тело
5004
Контроль

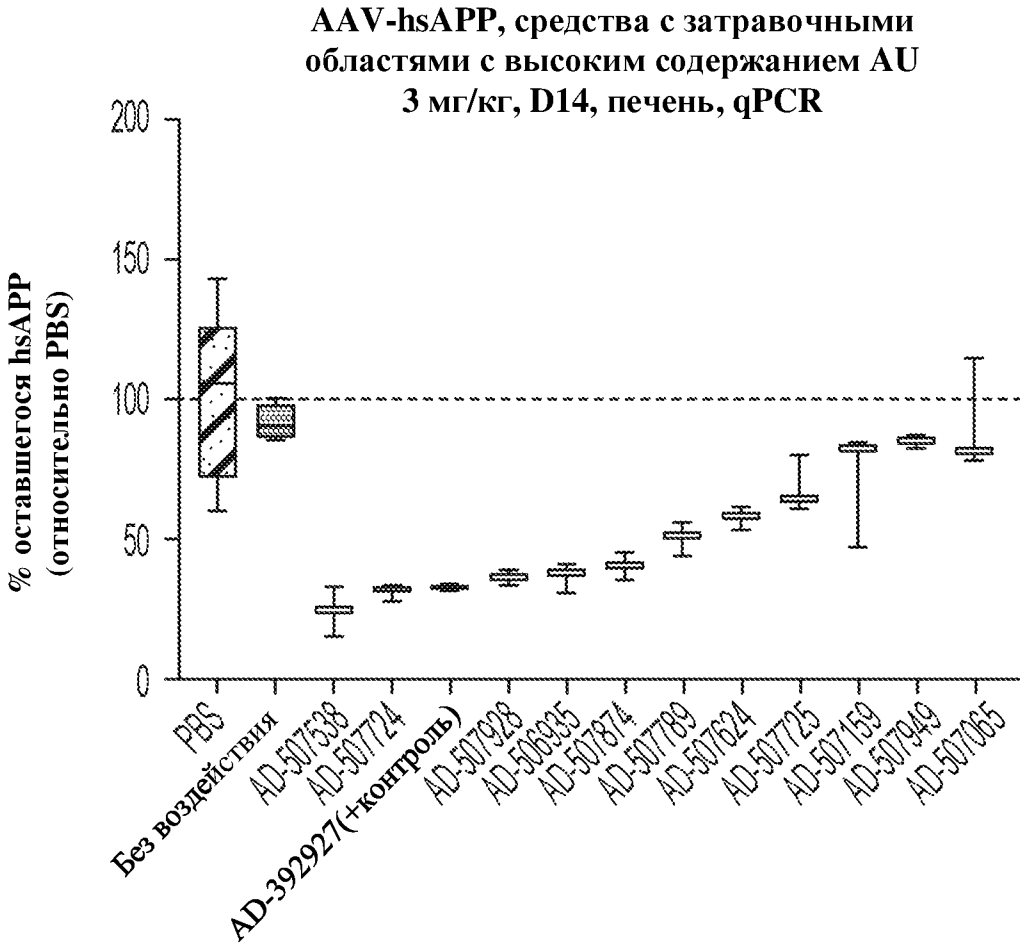
Фиг. 13E


2-C16
OMe
GNA
PS
F
AD-392927
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
AD-506935
AD-507065
AD-507159
AD-507538
AD-507624

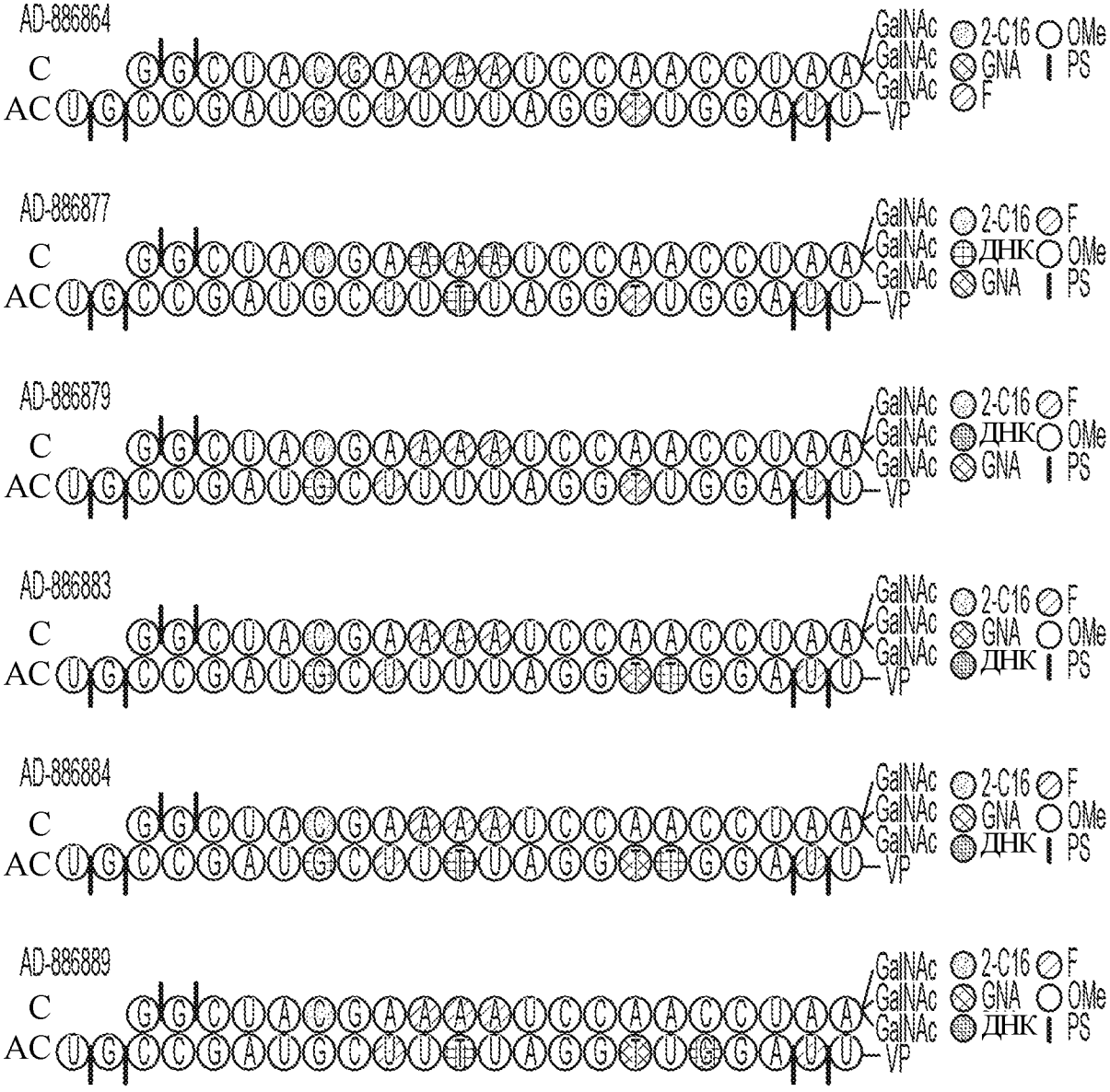
Фиг. 14A


AD-507724
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS
AD-507725
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS
AD-507789
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS
AD-507874
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS
AD-507928
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS
AD-507949
C
AC
GalNAc
GalNAc
GalNAc
F
OMe
PS

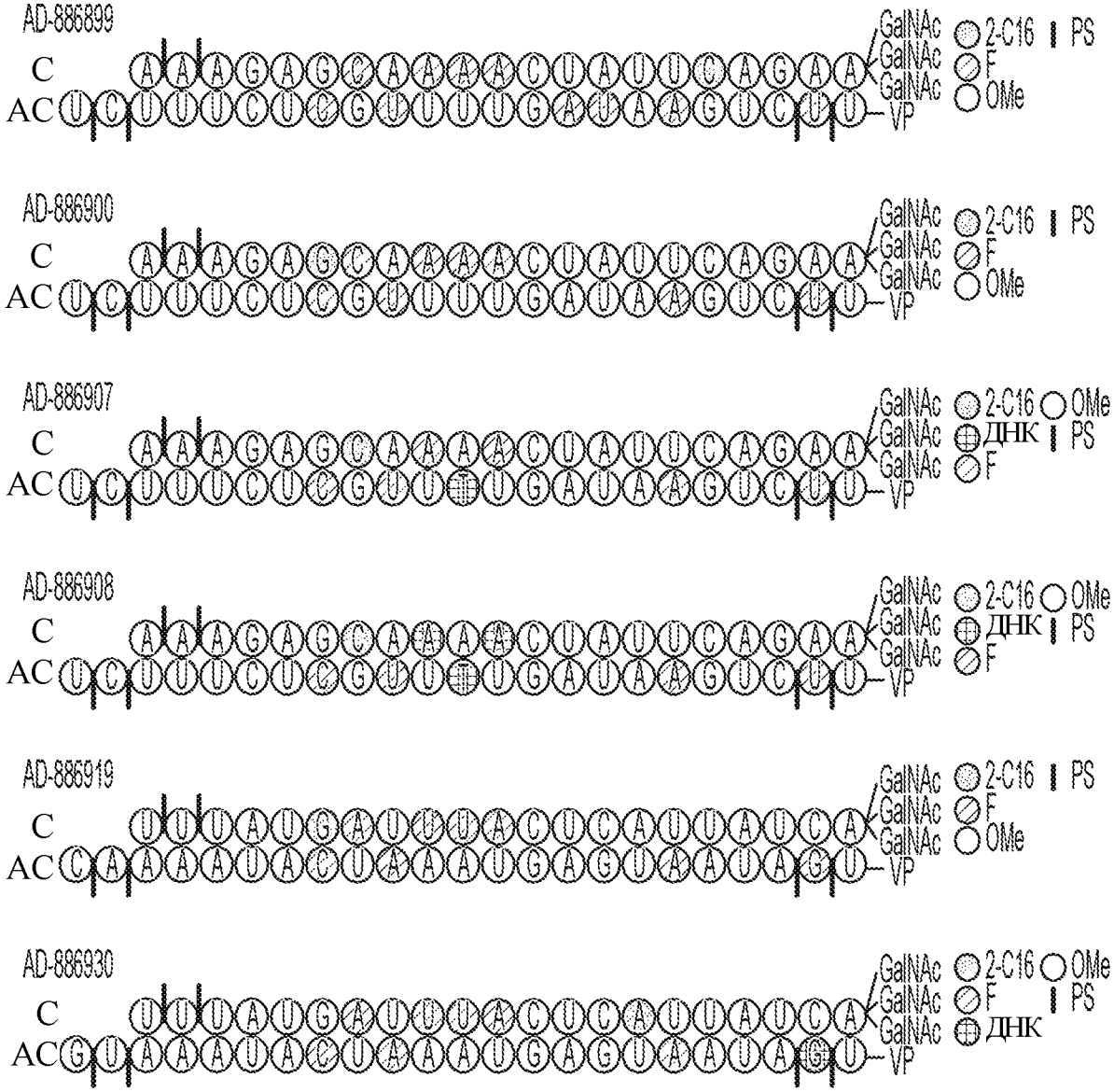
Фиг. 14B


AAV-hsAPP, средства с затравочными областями с высоким содержанием AU
3 мг/кг, D14, печень, qPCR
% оставшегося hsAPP (относительно PBS)
200
150
100
50
0
PBS
Без воздействия
AD-507538
AD-507724
AD-392927(+контроль)
AD-507928
AD-506935
AD-507874
AD-507789
AD-507624
AD-507725
AD-507159
AD-507949
AD-507065

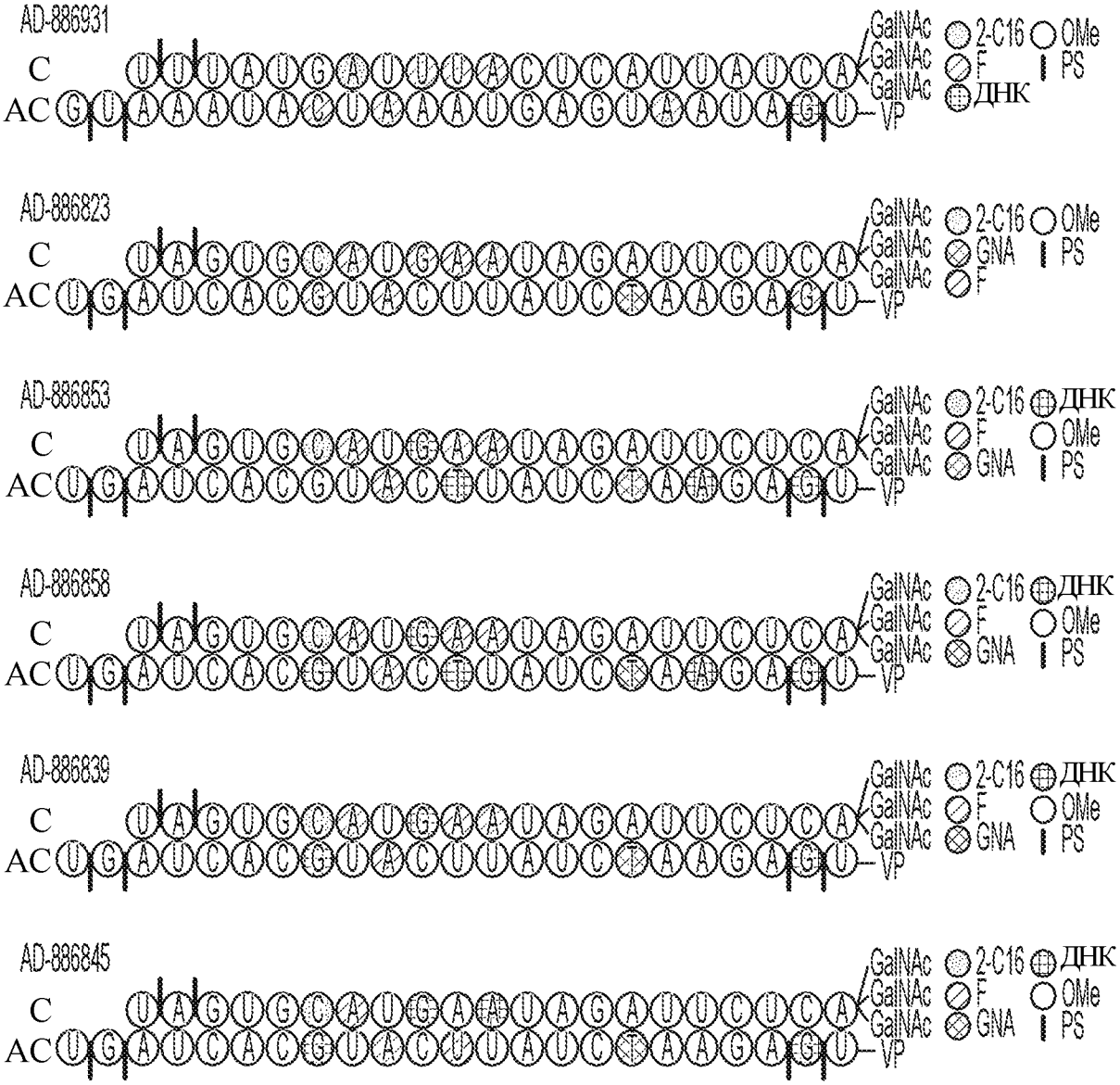
Фиг. 15


AD-886864
AD-886877
AD-886879
AD-886883
AD-886884
AD-886889
GalNAc
2-C16
OMe
GNA
PS
F
ДНК
VP

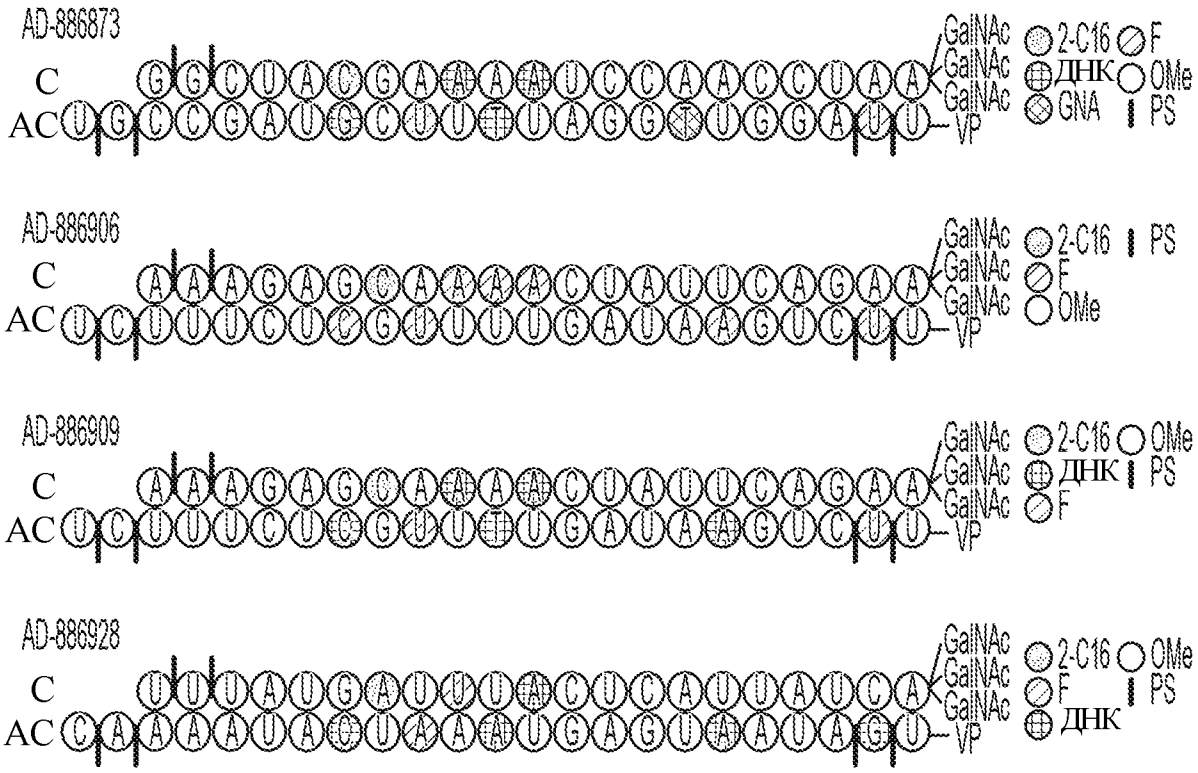
Фиг. 16A


AD-886899
AD-886900
AD-886907
AD-886908
AD-886919
AD-886930
GalNAc
2-C16
PS
F
OMe
ДНК
VP

Фиг. 16B


AD-886931
AD-886823
AD-886853
AD-886858
AD-886839
AD-886845
GalNAc
2-C16
OMe
F
PS
ДНК
GNA
VP

Фиг. 16C


AD-886873
AD-886906
AD-886909
AD-886928
GalNAc
2-C16
F
ДНК
OMe
GNA
PS
VP

Фиг. 16D

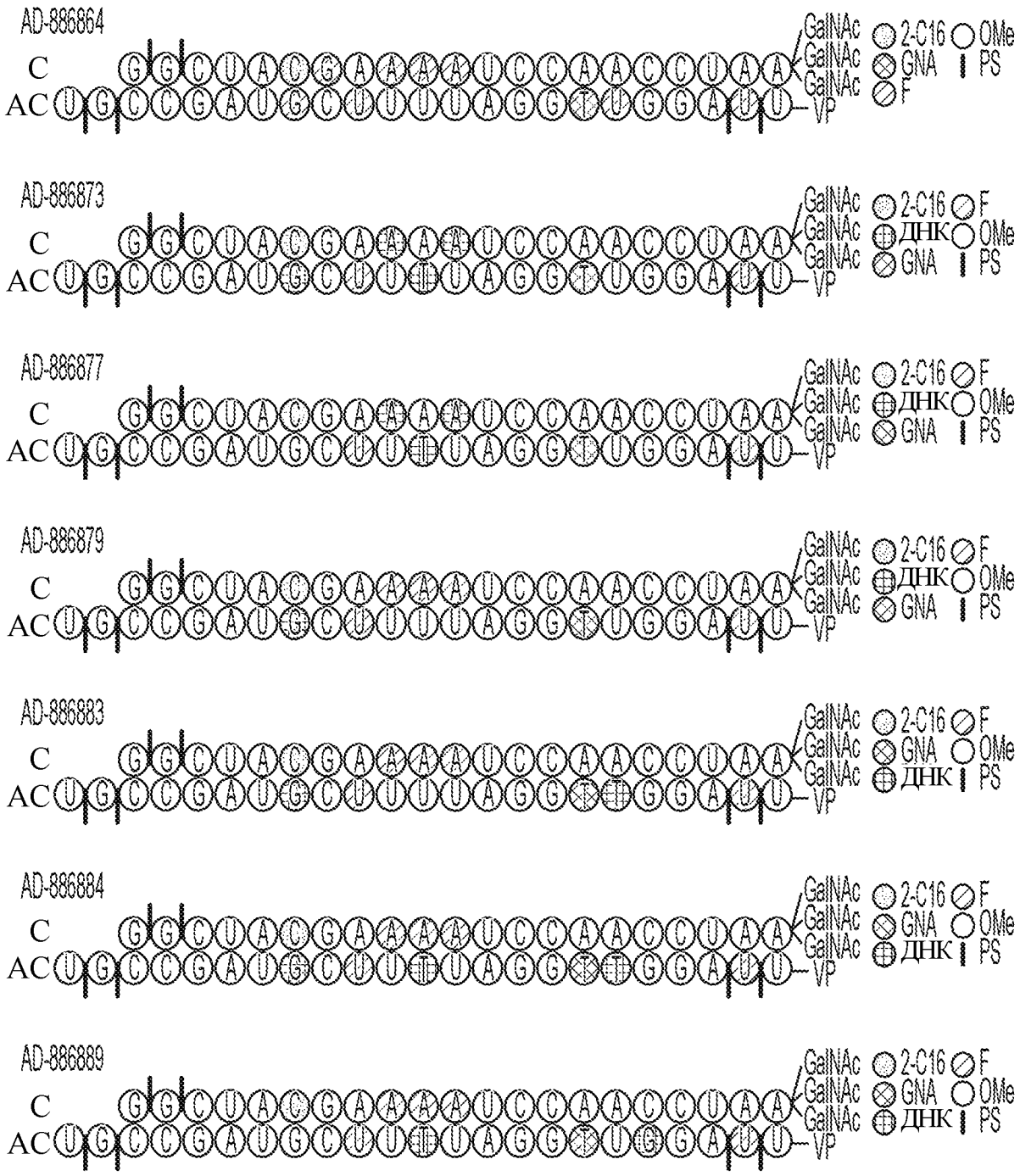
825 - hAPP (AAV), ID лидерных средств
3 мг/кг, SC, D14, печень, qPRC
% оставшейся мРНК
(относительно PBS)
150
125
100
75
50
25
0
PBS
Без воздействия (только AAV)
AD-886864
AD-886873
AD-886877
AD-886879
AD-886883
AD-886884
AD-886889
AD-886899
AD-886900
AD-886906
AD-886907
AD-886908
AD-886909
AD-886919
AD-886928
AD-886930
AD-886931
AD-886923
AD-886953
AD-886958
AD-886839
AD-886845

Фиг. 17A

825 - hAPP (AAV), ID лидерных средств
3 мг/кг, SC, D14, печень, qPRC
% оставшейся мРНК
(относительно PBS)
150
125
100
75
50
25
0
PBS
Без воздействия
(только AAV)
AD-886864
AD-886873
AD-886877
AD-886879
AD-886883
AD-886884
AD-886889
AD-886899
AD-886900
AD-886906
AD-886907
AD-886908
AD-886909
AD-886919
AD-886928
AD-886930
AD-886931
AD-886923
AD-886953
AD-886958
AD-886939
AD-886945

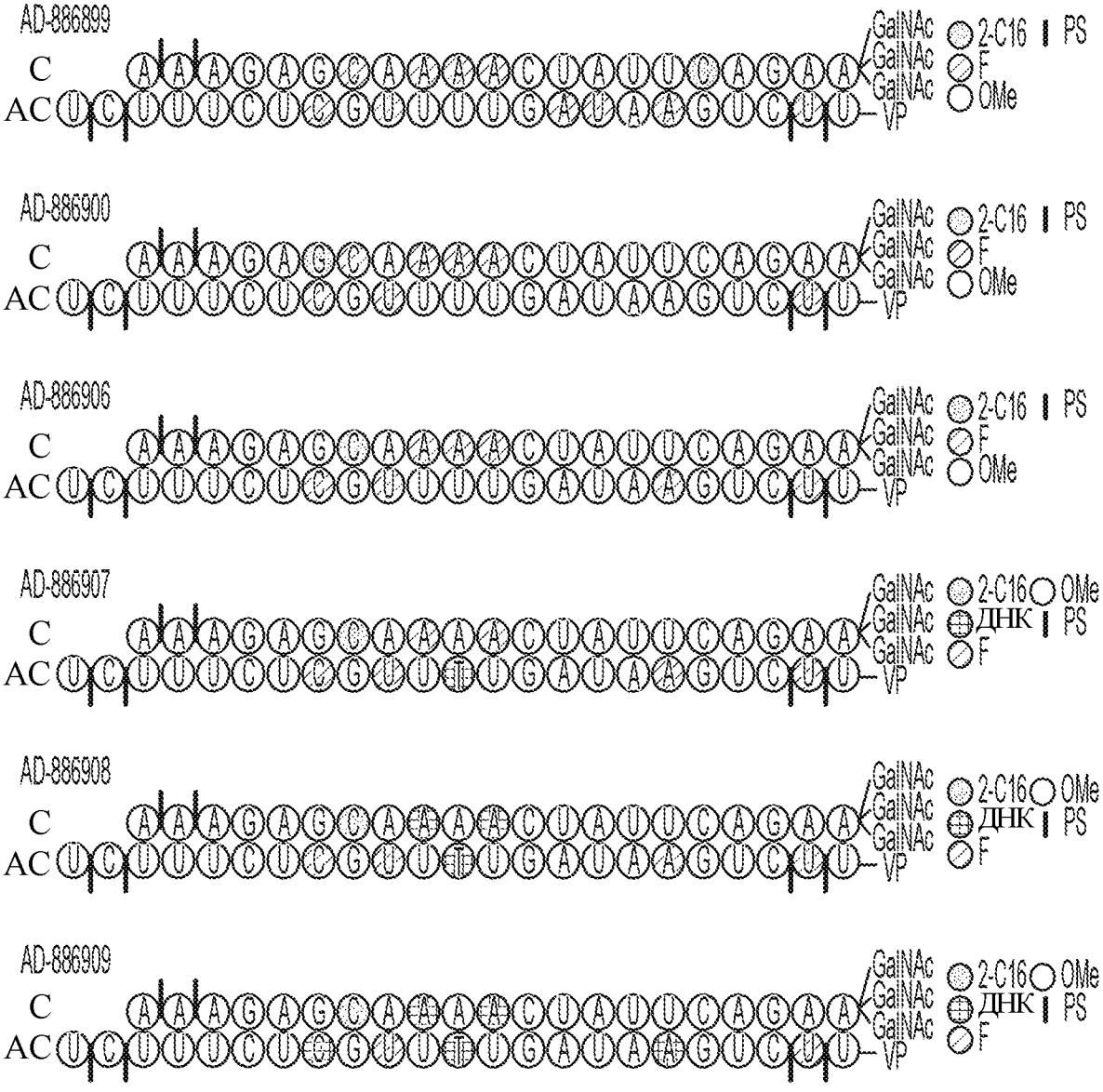
Фиг. 17B

AD-886864



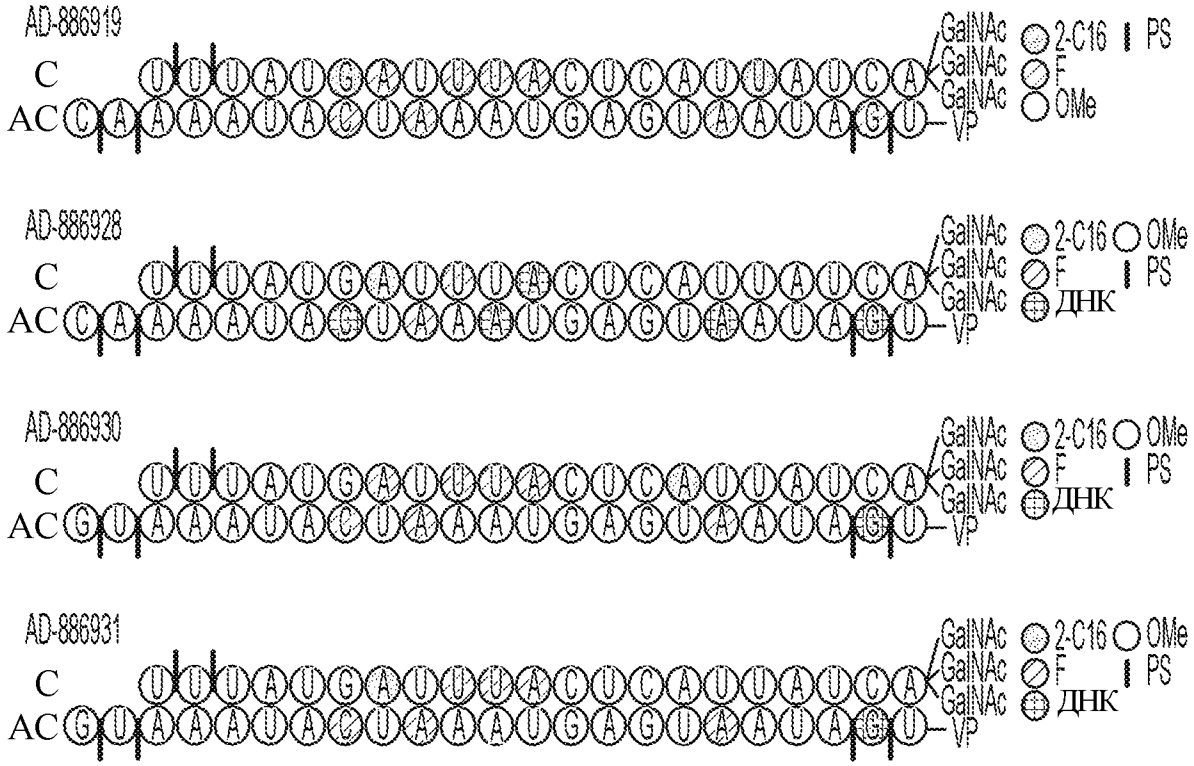
Фиг. 18A

AD-886899



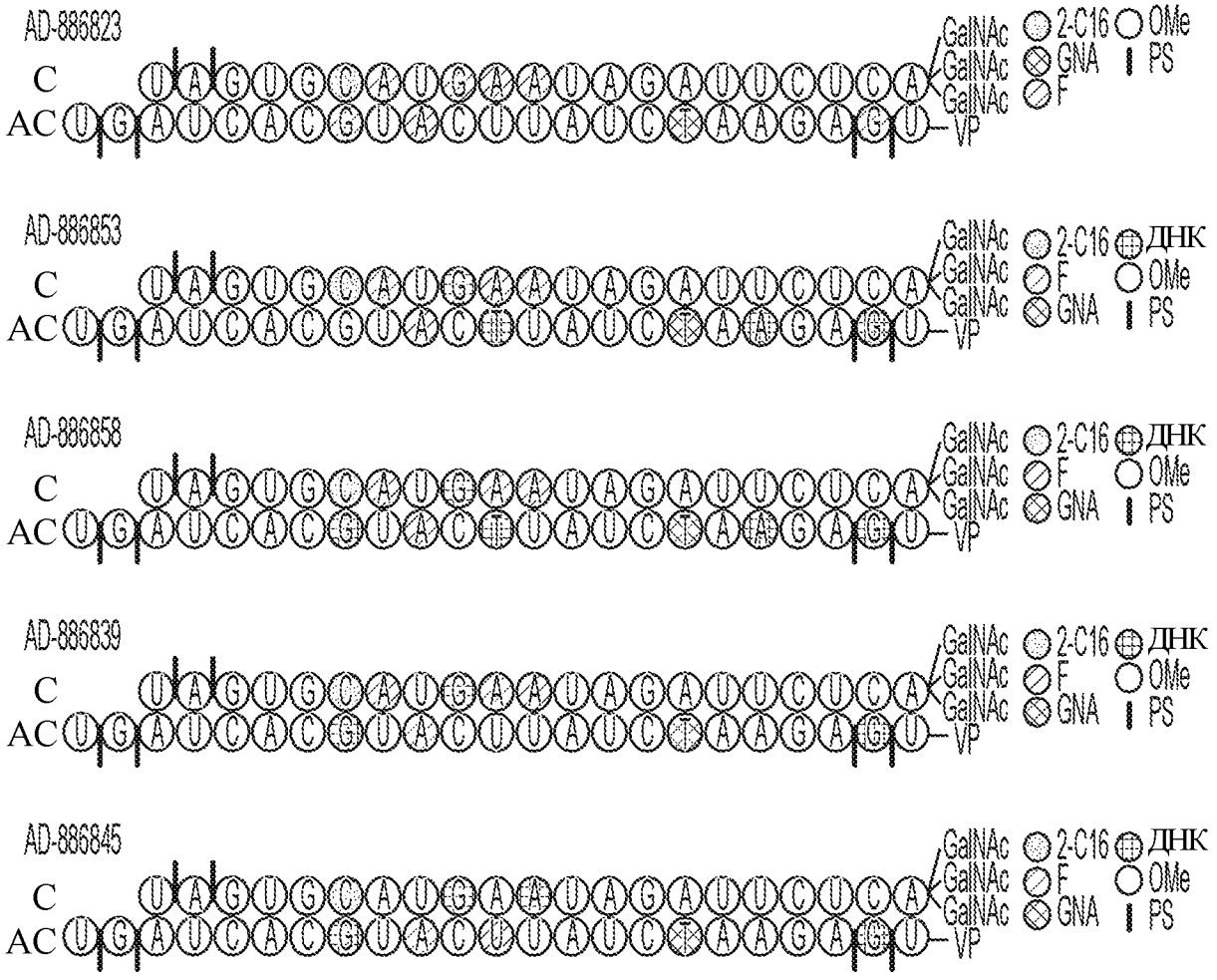
Фиг. 18B

AD-886919



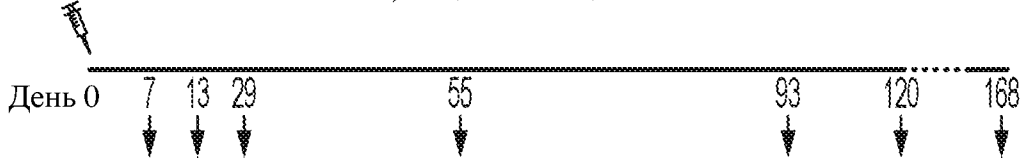
Фиг. 18C

AD-886823

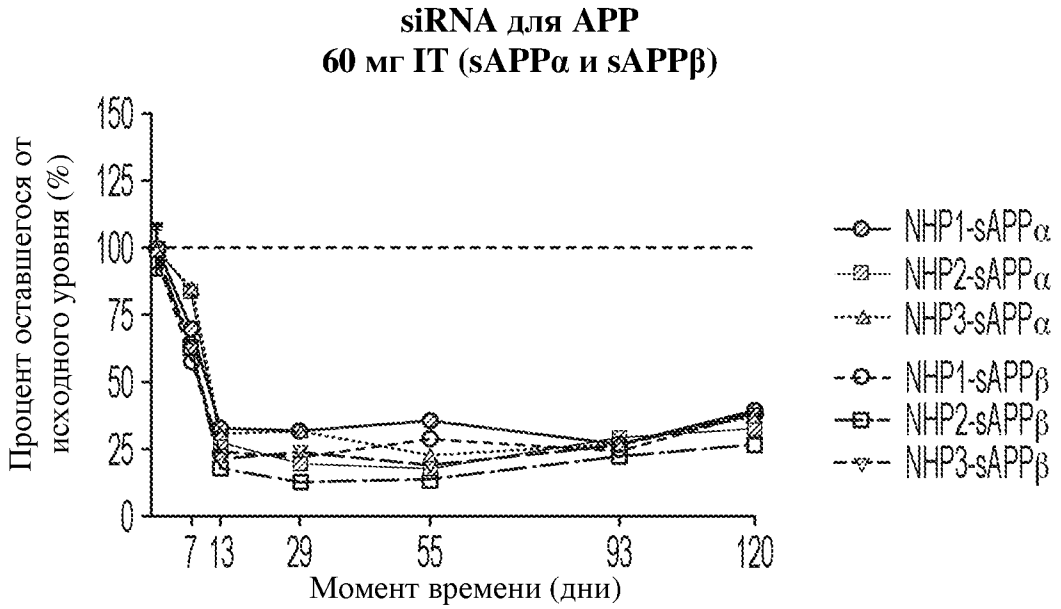


Фиг. 18D

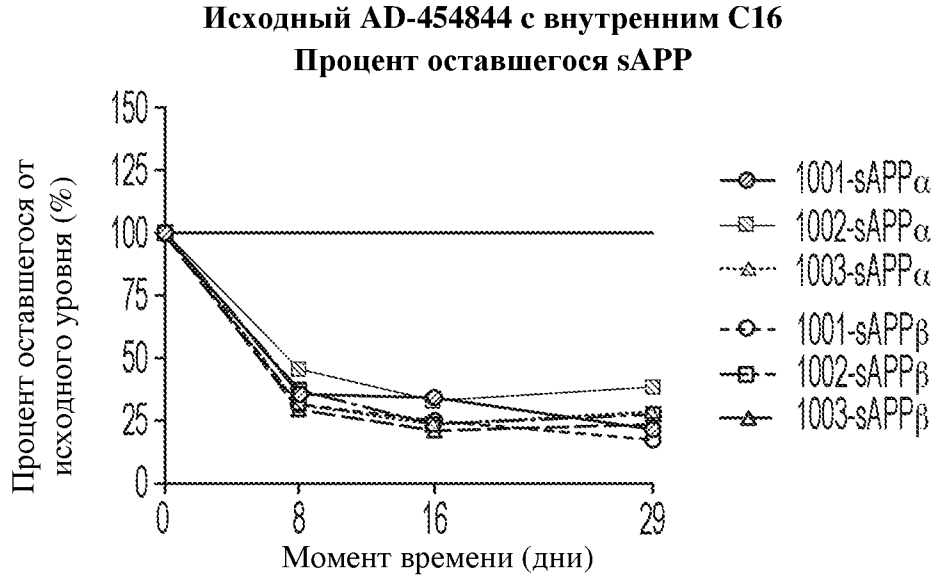
Однократная 60 мг IT доза конъюгата для ЦНС с siRNA, нацеливающейся на APP



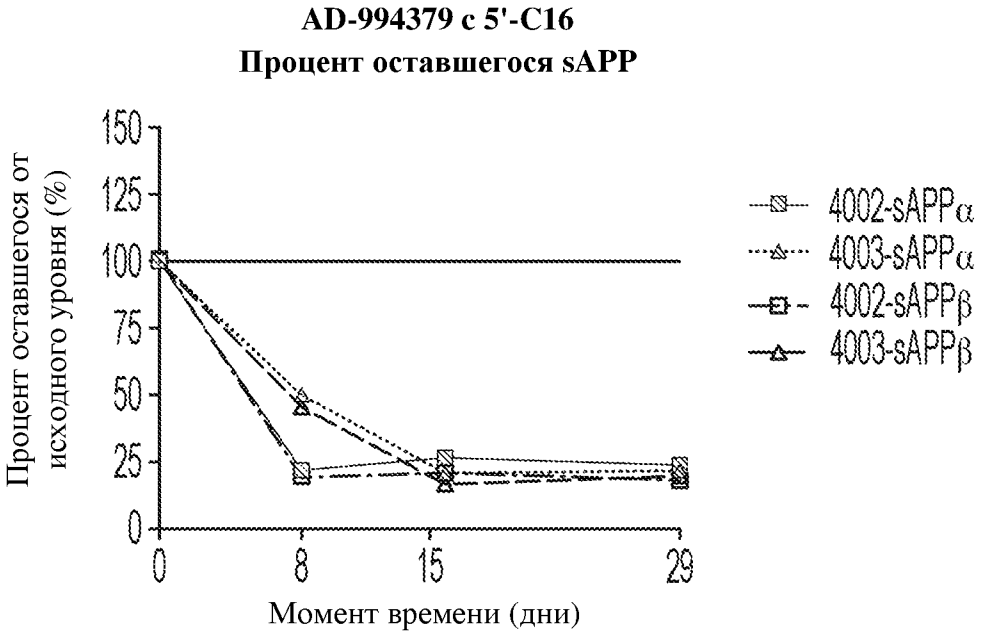
Фиг. 19



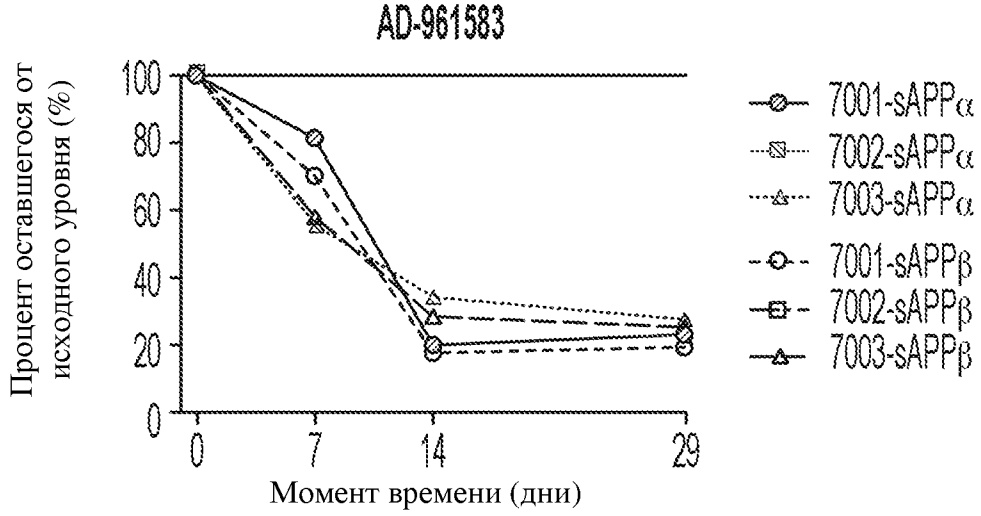
Фиг. 20A



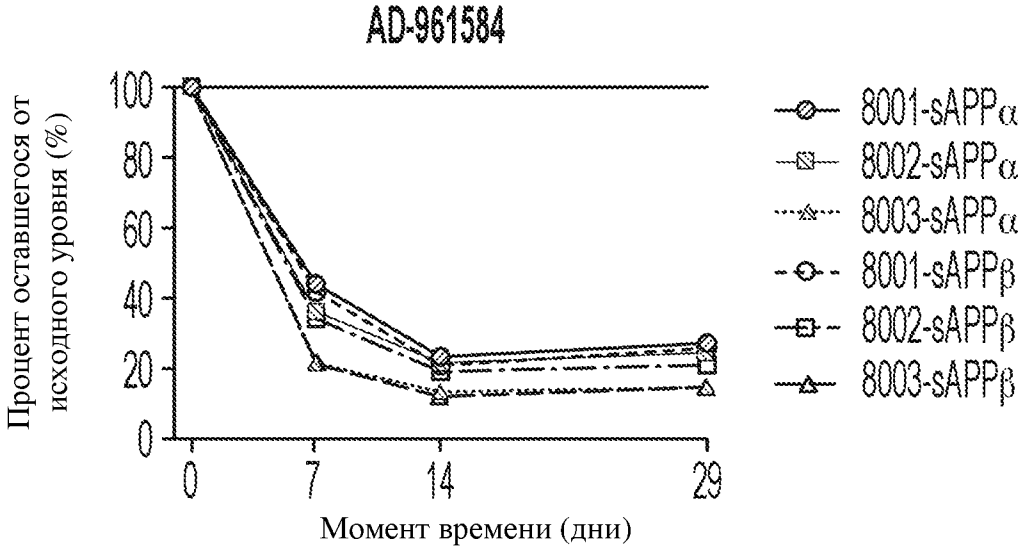
Фиг. 20B



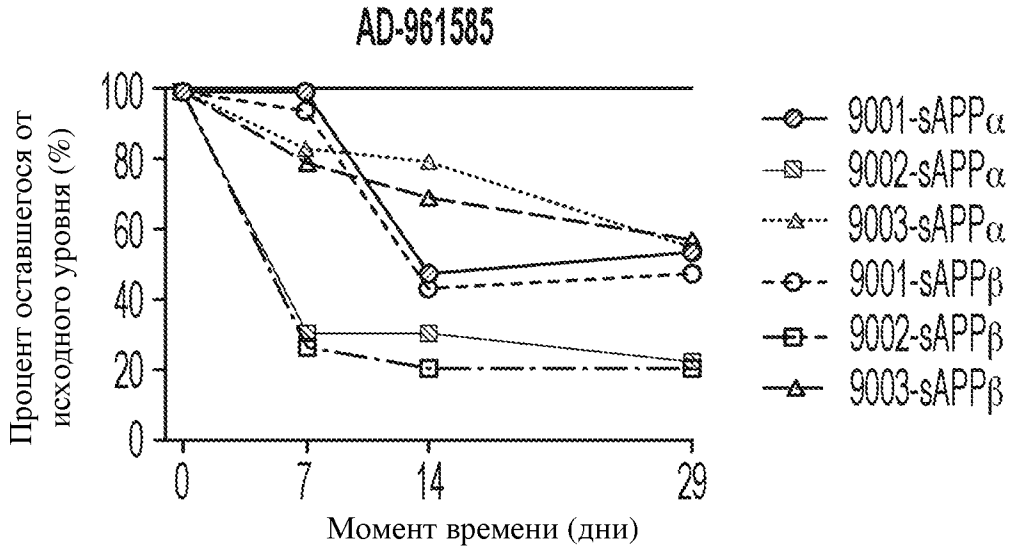
Фиг. 20C



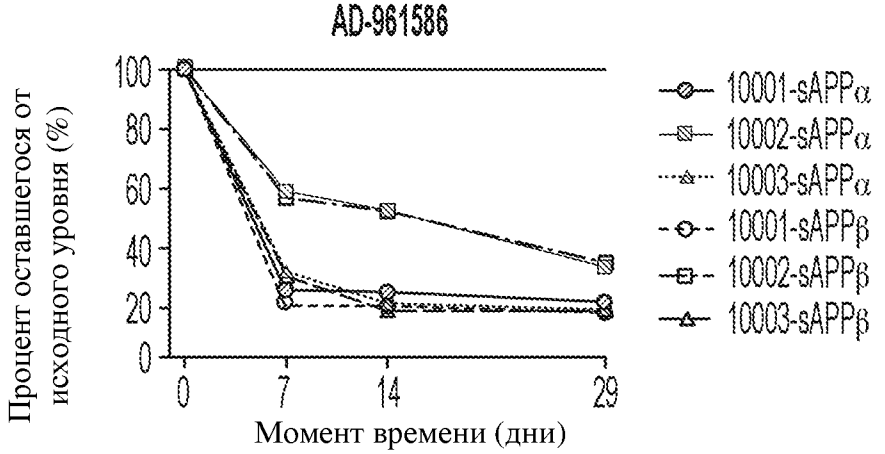
Фиг. 20D



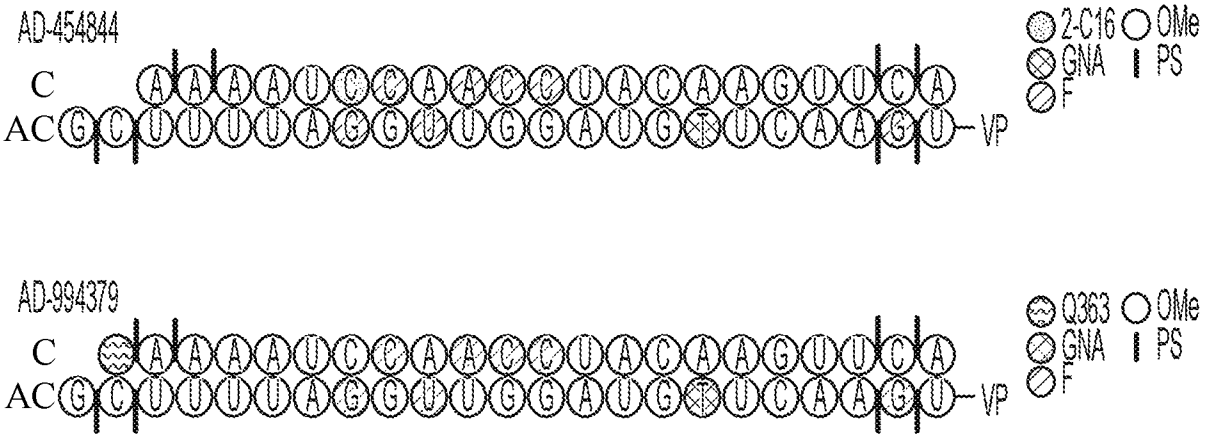
Фиг. 20E



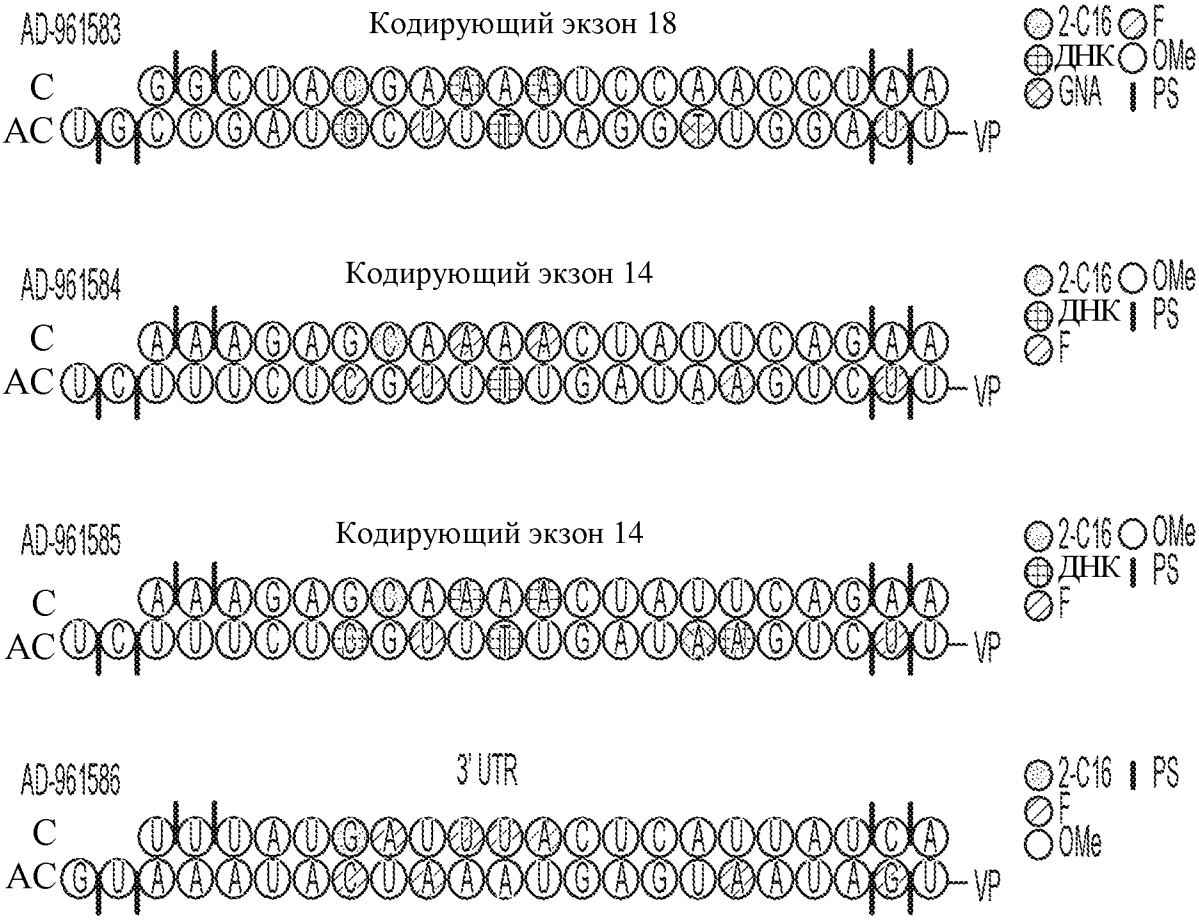
Фиг. 20F



Фиг. 20G



Фиг. 21A


AD-961583
Кодирующий экзон 18
C
AC
VP
2-C16
F
ДНК
OMe
GNA
PS
AD-961584
Кодирующий экзон 14
C
AC
VP
2-C16
OMe
ДНК
PS
F
AD-961585
Кодирующий экзон 14
C
AC
VP
2-C16
OMe
ДНК
PS
F
AD-961586
3' UTR
C
AC
VP
2-C16
PS
F
OMe

Фиг. 21B