

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040178**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.27**

(21) Номер заявки  
**202090234**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.07.05**

(51) Int. Cl. **C12N 15/11** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)

---

(54) **СРЕДСТВА РНКи ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ АЛЬФА-ЕНaC И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/529,132; 62/631,683; 62/679,549**

(32) **2017.07.06; 2018.02.17; 2018.06.01**

(33) **US**

(43) **2020.05.31**

(86) **PCT/US2018/040874**

(87) **WO 2019/010274 2019.01.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭРРОУХЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ли Чжэнь, Чжу Жуй, Пэй Тао,  
Николас Энтони, Буш Эрик У. (US)**

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

(56) **US-A1-20110288154  
US-A1-20150284726**

---

(57) Описаны средства РНКи, композиции, которые включают средства РНКи, и способы ингибирования гена альфа-ЕНaC (SCNN1A). Альфа-ЕНaC средства РНКи и конъюгаты средств РНКи, раскрытые в настоящем документе, ингибируют экспрессию гена альфа-ЕНaC. Также описаны фармацевтические композиции, которые включают одно или более альфа-ЕНaC средств РНКи, необязательно с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Доставка описанных альфа-ЕНaC средств РНКи в эпителиальные клетки, такие как эпителиальные клетки легких, *in vivo* обеспечивает ингибирование экспрессии гена альфа-ЕНaC и снижение активности ЕNaC, что может обеспечивать терапевтический эффект у субъектов, в том числе людей.

---

**В1**

**040178**

**040178  
В1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США 62/679549, поданной 1 июня 2018 г., предварительной заявки на патент США 62/631683, поданной 17 февраля 2018 г., и предварительной заявки на патент США 62/529132, поданной 6 июля 2017 г., содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей их полноте.

### **Список последовательностей**

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в формате ASCII и настоящим включен посредством отсылки во всей его полноте. Копия ASCII имеет название 30656\_SequenceListing и размер 74 КБ.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к средствам РНК-интерференции (РНКи), например двухпочечным средствам РНКи, для ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC композициям, которые включают альфа-ENaC средства РНКи, и способам их применения.

### **Уровень техники**

Амилорид-чувствительный эпителиальный натриевый канал позвоночных (ENaC или амилорид-чувствительный натриевый канал) является представителем суперсемейства дегенерин/ENaC каналов, характеризующимся наличием двух трансмембранных доменов, внутриклеточных N- и C-концов и большой внеклеточной петли, которая является субстратом для протеазы фурина. Канал представляет собой гетеротримерный комплекс, состоящий из трех гомологичных субъединиц (альфа ( $\alpha$ ), бета ( $\beta$ ) и гамма ( $\gamma$ )), кодируемых тремя отдельными генами: SCNN1A (альфа), SCNN1B (бета) и SCNN1G (гамма). Для полной активности канала необходимы все три субъединицы. Четвертая субъединица (дельта ( $\delta$ )), кодируемая SCNN1D, экспрессируется в яичках и яичниках и может функционально заменять альфа ( $\alpha$ ) субъединицу в этих тканях.

ENaC экспрессируется на апикальной мембране эпителиальных клеток, в частности, в легких, почечных дистальных извитых канальцах, желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), половых путях и эпителии поверхности глаза в глазу. В этих типах эпителия каналы ENaC опосредуют входящий поток внеклеточных ионов натрия, которые затем активно транспортируются из клетки базолатеральной натрий/калиевой АТФазой, создавая осмотический градиент и вызывая абсорбцию эпителиальной люминальной воды в интерстиции. В почках ENaC опосредует электролитный баланс и артериальное давление и является мишенью для системных низкомолекулярных диуретиков, таких как амилорид. В легких эпителиальный ENaC дыхательных путей играет ключевую роль в регуляции гидратации легких и мукоцилиарного клиренса.

У пациентов с псевдогипоальдостеронизмом (PHA) 1-го типа, которые несут мутации с потерей функции в SCNN1A, SCNN1B или SCNN1G, вырабатывается избыток жидкости на поверхности дыхательных путей, при этом они имеют значительно более высокие показатели мукоцилиарного клиренса. В то же время активность эпителиального ENaC дыхательных путей значительно повышена у пациентов с муковисцидозом (МВ) всех генотипов. Повышенная активность ENaC наряду с пониженной активностью хлоридного канала трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) при муковисцидозе является основным патогенным механизмом, лежащим в основе дегидратации дыхательных путей и застоя слизи у больных МВ с заболеванием легких.

Ингаляционные низкомолекулярные ингибиторы ENaC показали многообещающие предварительные результаты при лечении МВ, однако их клинические исследования были ограничены малой продолжительностью действия в легких и токсическим действием в целевой ткани (гиперкалиемия), связанным с ингибированием почечного ENaC (см., например, O'Riordan et al., 27 J. Aerosol Med.&Pulmonary Drug Dev., 200-208 (2014)).

Определенные средства РНКи, способные ингибировать экспрессию гена альфа-ENaC (т.е. SCNN1A), были идентифицированы ранее (такие гены, которые описаны, например, в патенте США 7718632). Однако последовательности и модификации агентов альфа-ENaC РНКи, раскрытые в настоящем документе, отличаются от раскрытых ранее или известных в уровне техники. Раскрытые в настоящем документе средства альфа-ENaC РНКи обеспечивают мощное и эффективное ингибирование экспрессии гена альфа-ENaC.

### **Сущность изобретения**

Существует потребность в новых средствах РНК-интерференции (РНКи) (называемых средством РНКи, РНКи триггером или триггером), например двухпочечных средствах РНКи, которые способны селективно и эффективно ингибировать экспрессию гена альфа-ENaC (т.е. SCNN1A). Кроме того, существует потребность в композициях новых альфа-ENaC-специфичных средств РНКи для лечения заболеваний, связанных с повышенной активностью ENaC.

В целом в настоящем изобретении представлены специфичные к гену альфа-ENaC средства РНКи, композиции, которые включают альфа-ENaC средства РНКи, и способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC *in vitro* и/или *in vivo* с применением альфа-ENaC средств РНКи, а также композиции, которые включают альфа-ENaC средства РНКи, описанные в настоящем документе. Альфа-ENaC средства

РНКи, описанные в настоящем документе, способны селективно и эффективно снижать экспрессию гена альфа-ENaC и, таким образом, снижать уровни ENaC у субъекта, снижать активность ENaC у субъекта или одновременно снижать и уровни ENaC, и активность ENaC у субъекта, например человека или подопытного животного.

Описанные альфа-ENaC средства РНКи могут применяться в способах терапевтического лечения (включая превентивное или профилактическое лечение) симптомов и заболеваний, связанных с увеличенными или повышенными уровнями активности ENaC, включая без ограничения различные респираторные заболевания, такие как муковисцидоз, хронический бронхит, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), астму, инфекции дыхательных путей, первичную цилиарную дискинезию и карциному легкого при муковисцидозе. Например, у субъектов, страдающих муковисцидозом (МВ), повышенная активность ENaC, как известно, способствует высыханию слизи в дыхательных путях и снижению способности легких выводить токсины и инфекционные агенты. Кроме того, также известно, что субъекты с МВ, унаследовавшие гены ENaC с нарушенной функцией, демонстрировали более легкое заболевание легких, что представляет дополнительные доказательства того, что ингибирование уровней ENaC может быть эффективным у некоторых групп пациентов. Описанные альфа-ENaC средства РНКи также могут применяться, например, для терапевтического лечения (включая профилактическое или превентивное лечение) симптомов и заболеваний, связанных с увеличенными или повышенными уровнями активности ENaC в эпителии поверхности глаза, таком как эпителий конъюнктивы, в том числе для лечения глазных заболеваний и нарушений, таких как синдром сухого глаза. Раскрытые в настоящем документе альфа-ENaC средства РНКи могут селективно снижать экспрессию альфа-ENaC, что может приводить к снижению активности ENaC. Раскрытые в настоящем документе способы включают введение одного или более альфа-ENaC средств РНКи субъекту, например человеку или животному, любыми подходящими способами, известными в данной области, такими как аэрозольная ингаляция или ингаляция сухим порошком, интраназальное введение, внутритрахеальное введение или орофарингеальное аспирационное введение.

В одном аспекте изобретения представлены средства РНКи для ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где средство РНКи включает в себя смысловую цепь и антисмысловую цепь. Также в настоящем документе описаны композиции, которые включают или состоят из средства РНКи, способного ингибировать экспрессию гена альфа-ENaC, где средство РНКи включает или состоит из смысловой цепи и антисмысловой цепи и композиция дополнительно включает по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В другом аспекте изобретения представлены композиции, которые включают одно или более раскрытых альфа-ENaC средств РНКи, которые способны селективно и эффективно снижать экспрессию гена альфа-ENaC. Композиции, которые включают одно или более альфа-ENaC средств РНКи, описанных в настоящем документе, могут быть введены субъекту, такому как человек или подопытное животное, для лечения (включая профилактическое лечение или ингибирование) симптомов и заболеваний, связанных с увеличенной или повышенной активностью ENaC (также указанной в настоящем документе как увеличенные уровни активности канала ENaC или повышенные уровни активности канала ENaC).

Каждое альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть частично, по существу или полностью комплементарными друг другу. Длина смысловой и антисмысловой цепей средства РНКи, описанного в настоящем документе, может составлять 16-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 17-26 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину или разную длину. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 21-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 21-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепи имеют длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая и/или антисмысловая цепи независимо имеют длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. Средства РНКи, описанные в настоящем документе, после доставки в клетку, экспрессирующую альфа-ENaC, ингибируют экспрессию одного или более генов альфа-ENaC *in vivo* или *in vitro*.

Альфа-ENaC средство РНКи, описанное в настоящем документе, включает по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, которые обладают по меньшей мере 85% идентичностью с последовательностью основного участка (также именуемой в настоящем документе как "основной участок" или "основная последовательность"), содержащего такое же количество нуклеотидов, в мРНК альфа-ENaC. В некоторых вариантах осуществления этот основной участок смысловой цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления этот основной участок смысловой цепи имеет длину 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления этот основной участок смысловой цепи имеет длину 19 нуклеотидов.

Антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, описанного в настоящем документе, включает по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов, которые обладают по меньшей мере 85% комплементарностью с основным участком, содержащим такое же количество нуклеотидов, в мРНК альфа-ENaC и

с соответствующей смысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления этот основной участок антисмысловой цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, направленно взаимодействуют с частью гена альфа-ENaC, имеющего последовательность любой из последовательностей, раскрытых в табл. 1.

Примеры смысловых цепей и антисмысловых цепей альфа-ENaC средства РНКи, которые могут применяться в альфа-ENaC средстве РНКи, представлены в табл. 3 и 4. Примеры дуплексов альфа-ENaC средства РНКи представлены в табл. 5. Примеры 19-нуклеотидных последовательностей основного участка, которые могут состоять из или могут быть включены в смысловые цепи и антисмысловые цепи некоторых альфа-ENaC средств РНКи, раскрытых в настоящем документе, представлены в табл. 2.

В другом аспекте изобретения представлены способы доставки альфа-ENaC средств РНКи в эпителиальные клетки у субъекта, такого как млекопитающее, *in vivo*. Также в настоящем документе описаны композиции для применения в таких способах. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы доставки альфа-ENaC средств РНКи в эпителиальные клетки легких *in vivo* субъекту. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы доставки альфа-ENaC средств РНКи в эпителиальные клетки легких субъекта-человека *in vivo*. Одно или более альфа-ENaC средств РНКи могут быть доставлены в клетки-мишени или ткани с применением любой технологии доставки олигонуклеотидов, известной в уровне техники. Способы доставки нуклеиновой кислоты включают доставку без ограничения путем инкапсуляции в липосомах, путем ионтофореза или путем включения в другие носители, такие как гидрогели, циклодекстрины, биоразлагаемые нанокапсулы и биоадгезивные микросферы, белковые векторы или Dynamic Polyconjugates™ (DPC) (см., например, WO 2000/053722, WO 2008/022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, которые включены в настоящий документ посредством отсылки).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи доставляют в клетки или ткани путем ковалентного связывания средства РНКи с направляющей группой. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа может включать лиганд клеточного рецептора, такой как лиганд, направленно взаимодействующий с интегрином. Интегрины являются семейством трансмембранных рецепторов, которые способствуют адгезии клетки-внеклеточного матрикса (ECM). В частности, интегрин альфа- $\nu$ -бета-6 ( $\alpha\nu\beta6$ ) представляет собой специфичный к эпителию интегрин, который, как известно, является рецептором ECM белков и ассоциированного с латентностью пептида TGF-бета (LAP) и экспрессируется в различных клетках и тканях. Известно, что экспрессия интегрин  $\alpha\nu\beta6$  сильно повышена в поврежденном легочном эпителии. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, описанные в настоящем документе, связаны с лигандом, направленно взаимодействующим с интегрином, который обладает аффинностью к интегину  $\alpha\nu\beta6$ . Как указано в настоящем документе, "направленно взаимодействующий с интегрином  $\alpha\nu\beta6$  лиганд" является соединением, обладающим аффинностью к интегину  $\alpha\nu\beta6$ , которое можно применять в качестве лиганда, способствующего направленному взаимодействию и доставке средства РНКи, к которому он присоединен, в нужные клетки и/или ткани (т.е. в клетки, экспрессирующие интегрин  $\alpha\nu\beta6$ ). В некоторых вариантах осуществления множество лигандов, направленно взаимодействующих с интегрином  $\alpha\nu\beta6$ , или кластеры лигандов, направленно взаимодействующих с интегрином  $\alpha\nu\beta6$ , соединены с альфа-ENaC средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты альфа-ENaC средства РНКи-лиганда, направленно взаимодействующего с интегрином  $\alpha\nu\beta6$ , селективно интернализируются эпителиальными клетками легких либо посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, либо другими способами.

Примеры направляющих групп, подходящих для доставки альфа-ENaC средств РНКи, которые включают интегрин  $\alpha\nu\beta6$ -направляющие лиганды, раскрыты, например, в публикации международной заявки WO 2018/085415 и в предварительных заявках на патент США 62/580398 и 62/646739, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством отсылок во всей их полноте.

Направляющая группа может быть связана с 3' или 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи альфа-ENaC средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа связана с 3' или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа связана с 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа связана внутренне с нуклеотидом на смысловой цепи и/или антисмысловой цепи средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа связана со средством РНКи через линкер.

Направляющая группа с или без линкера может быть присоединена к 5' или 3'-концу любой из смысловых и/или антисмысловых цепей, раскрытых в табл. 2, 3 и 4. Линкер с или без направляющей группы может быть присоединен к 5' или 3'-концу любой из смысловых и/или антисмысловых цепей, раскрытых в табл. 2, 3 и 4.

В другом аспекте изобретения представлены композиции, которые включают одно или более альфа-ENaC средств РНКи, которые имеют дуплексные структуры, раскрытые в табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции, которые включают комбинацию или смесь по меньшей мере двух альфа-ENaC средств РНКи, имеющих разные

последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждое из двух или более альфа-ENaC средств РНКи отдельно и независимо связаны с направляющими группами. В некоторых вариантах осуществления каждое из двух или более альфа-ENaC средств РНКи связаны с направляющими группами, которые включают или состоят из интегрин-направляющих лигандов. В некоторых вариантах осуществления каждое из двух или более альфа-ENaC средств РНКи соединены с направляющими группами, которые включают или состоят из  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющих лигандов.

В другом аспекте изобретения представлены способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC у субъекта, включающие введение субъекту некоторого количества альфа-ENaC средства РНКи, способного ингибировать экспрессию гена альфа-ENaC, где альфа-ENaC средство РНКи включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Также в настоящем документе описаны композиции для применения в таких способах.

В другом аспекте изобретения представлены способы лечения (включая профилактическое или превентивное лечение) заболеваний или симптомов, вызванных увеличенной или повышенной активностью ENaC, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту альфа-ENaC средства РНКи, которое включает антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3. Также в настоящем документе описаны композиции для применения в таких способах.

В некоторых вариантах осуществления описанные альфа-ENaC средства РНКи необязательно комбинируют с одним или более дополнительными (т.е. вторым, третьим и т.д.) терапевтическими средствами. Второе терапевтическое средство может быть другим альфа-ENaC средством РНКи (например, альфа-ENaC средством РНКи, которое направлено на другую последовательность в гене альфа-ENaC). Дополнительное терапевтическое средство также может быть низкомолекулярным лекарственным средством, антителом, фрагментом антитела и/или аптамером. Альфа-ENaC средства РНКи с или без одного или более дополнительных терапевтических средств могут комбинировать с одним или более вспомогательными веществами с получением фармацевтических композиций.

В некоторых вариантах осуществления описаны композиции для доставки альфа-ENaC средства РНКи в эпителиальную клетку *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи доставляют без конъюгирования с направляющим лигандом или модулятором фармакокинетики (ФК) (указано как "голое" или "голое средство РНКи"). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи конъюгировано с направляющей группой, соединительной группой, модулятором ФК и/или другой нуклеотидной группой. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи конъюгировано с направляющей группой, где направляющая группа включает интегрин-направляющий лиганд. В некотором варианте осуществления интегрин-направляющий лиганд является  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющим лигандом. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа включает один или более  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющих лигандов.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи связано с одной или более связывающими группами или другими нуклеотидными группами или соединениями, такими как модуляторы фармакокинетики. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи конъюгировано с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ) или гидрофобной группой, содержащей 12 или больше атомов углерода, такой как холестеринная или пальмитоильная группа. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи связано с одним или более модуляторами фармакокинетики, выбранными из холестерина или производных холестерина, алкильных групп, алкенильных групп, алкинильных групп, арильных групп, аралкильных групп, аралкенильных групп или аралкинильных групп, каждая из которых может быть линейной, разветвленной, циклической и/или замещенной или незамещенной. В некоторых вариантах осуществления положением присоединения этих групп является 5' или 3'-конец смысловой цепи, 2'-положение кольца рибозы любого возможного нуклеотида смысловой цепи и/или они присоединены к фосфатному или фосфотиоатному скелету в любом положении смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления одно или более из описанных альфа-ENaC средств РНКи вводят млекопитающему в фармацевтически приемлемом носителе или разбавителе. В некоторых вариантах осуществления млекопитающим является человек.

Применение альфа-ENaC средств РНКи обеспечивает способы терапевтического (в том числе профилактического) лечения заболеваний или нарушений, связанных с увеличенной или повышенной активностью ENaC. Описанные альфа-ENaC средства РНКи способны вызывать ингибирование (например, ингибировать) экспрессию альфа-ENaC. Альфа-ENaC средства РНКи также могут применяться для лечения различных респираторных заболеваний, включающих муковисцидоз, хронический бронхит, немукковисцидозный бронхоэктаз, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), астму, инфекции дыхательных путей, первичную цилиарную дискинезию и карциному легкого при муковисцидозе. Альфа-ENaC средства РНКи могут также применяться для лечения, например, различных глазных заболеваний и нарушений, таких как синдром сухого глаза. Такие способы лечения включают введение альфа-ENaC средства РНКи человеку или животному, имеющему увеличенные или повышенные уровни активности ENaC. В настоящем документе описаны композиции для доставки альфа-ENaC средств РНКи в эпителиальные клетки легких. Кроме того, в настоящем документе в целом описаны композиции для доставки

альфа-ENaC средств РНКи в клетки, включая эпителиальные клетки почки и/или эпителиальные клетки в ЖКТ или половых путях, и/или эпителиальные клетки поверхности глаза в глазу *in vivo*.

Фармацевтические композиции, включающие одно или более альфа-ENaC средств РНКи, могут вводить различными способами в зависимости от того, какое лечение требуется - местное или системное. Введение может быть, но не ограничивается, например, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, внутривнутрибрюшинным, подкожным (например, с применением имплантируемого устройства) и интрапаренхиматозным введением. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, вводят путем ингаляции (такой как аэрозольная ингаляция или ингаляция сухим порошком), интраназального введения, эндотрахеального введения или орофарингеального аспирационного введения.

Описанные альфа-ENaC средства РНКи и/или композиции, которые включают альфа-ENaC средства РНКи, могут применяться в способах терапевтического лечения заболеваний или состояний, вызванных увеличенными или повышенными уровнями активности ENaC. Такие способы включают введение альфа-ENaC средства РНКи, как описано в настоящем документе, субъекту, например человеку или подопытному животному.

В другом аспекте изобретения предложены способы лечения (включая профилактическое лечение) патологического состояния (такого как состояние или заболевание), опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией альфа-ENaC, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства РНКи, которое включает антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где способы включают введение в клетку средства РНКи, которое включает антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы лечения (включая профилактическое лечение) патологического состояния, опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией альфа-ENaC, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства РНКи, которое включает смысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где способы включают введение в клетку средства РНКи, которое включает смысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы лечения (включая профилактическое лечение) патологического состояния, опосредованного, по меньшей мере частично, экспрессией альфа-ENaC, где способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства РНКи, которое включает смысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 4, и антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где способы включают введение в клетку средства РНКи, которое включает смысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 4, и антисмысловую цепь, включающую последовательность любой из последовательностей в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где способы включают введение субъекту альфа-ENaC средства РНКи, которое включает смысловую цепь, состоящую из последовательности нуклеиновых оснований любой из последовательностей в табл. 4, и антисмысловую цепь, состоящую из последовательности нуклеиновых оснований любой из последовательностей в табл. 3. В других вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC, где способы включают введение субъекту альфа-ENaC средства РНКи, которое включает смысловую цепь, состоящую из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 4, и антисмысловую цепь, состоящую из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе раскрыты способы ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC в клетке, где способы включают введение одного или более альфа-ENaC средств РНКи, имеющих дуплексную структуру одного из дуплексов, представленных в табл. 5.

Альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, предназначены для направленного взаимодействия с определенными положениями гена альфа-ENaC (SEQ ID NO: 1). Как определено в настоящем документе, последовательность антисмысловой цепи предназначена для направленного взаимодействия с геном альфа-ENaC в данном положении на гене, когда 5'-концевое нуклеиновое основание антисмысловой цепи выровнено с положением, которое расположено через 19 нуклеотидов после (в направлении 3'-конца) положения на гене при спаривании оснований с геном. Например, как показано в табл. 1 и 2 в настоящем документе, последовательность антисмысловой цепи, предназначенная для направленного взаимодействия с геном альфа-ENaC в положении 972, требует, чтобы при спаривании ос-

нований с геном 5'-концевое нуклеиновое основание антисмысловой цепи было выровнено с положением 990 гена альфа-ENaC.

Как предусмотрено в настоящем документе, альфа-ENaC средство РНКи не требует, чтобы нуклеиновое основание в положении 1 (5'→3') антисмысловой цепи было комплементарно гену, при условии наличия по меньшей мере 85% комплементарности (например, по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарности) антисмысловой цепи и гена на протяжении последовательности основного участка длиной по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Например, для альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, которое предназначено для направленного взаимодействия с положением 972 гена альфа-ENaC, 5'-концевое нуклеиновое основание антисмысловой цепи альфа-ENaC средства РНКи должно быть выровнено с положением 990 гена. Однако 5'-концевое нуклеиновое основание антисмысловой цепи может, но не должно обязательно быть комплементарным положению 990 гена альфа-ENaC при условии наличия по меньшей мере 85% комплементарности (например, по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% комплементарности) антисмысловой цепи и гена на протяжении последовательности основного участка длиной по меньшей мере 16 последовательных нуклеотидов. Как показано, помимо прочего, в различных примерах, раскрытых в настоящем документе, определенный сайт связывания гена антисмысловой цепью альфа-ENaC средства РНКи (например, независимо от того, предназначено ли альфа-ENaC средство РНКи для направленного взаимодействия с геном альфа-ENaC в положении 972, в положении 1291, в положении 1000 или в некотором другом положении) является важным фактором для уровня ингибирования, обеспечиваемого альфа-ENaC средством РНКи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3), где SEQ ID NO: 3 расположена в положениях 1-21 (5'→3') антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотиоатную связь; и

где смысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна антисмысловой цепи.

Как будет очевидно для среднего специалиста в данной области, включение фосфотиоатной связи, как показано в модифицированных нуклеотидных последовательностях, раскрытых в настоящем документе, заменяет фосфодиэфирную связь, обычно присутствующую в олигонуклеотидах (см., например, фиг. 12A-12G, на которых показаны все межнуклеозидные связи).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотиоатную связь; и

где смысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной

последовательности (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5), где SEQ ID NO: 5 расположена в положениях 1-21 (5'→3') антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно; и s представляет собой фосфотиоатную связь; и

где антисмысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотиоатную связь; и

где антисмысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков присоединены к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи или к 5' и 3'-концам смысловой цепи SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления направляющий лиганд, такой как  $\alpha\beta\delta$  интегрин-направляющий лиганд, может быть ковалентно связан с 5'-концом смысловой цепи, с 3'-концом смысловой цепи или с 5' и с 3'-концом смысловой цепи SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами; и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотионатную связь.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце и  $\alpha\upsilon\beta\delta$  интегрин-направляющий лиганд, ковалентно связанный с 5'-концом.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, которая отличается 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO: 7), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO: 7), где SEQ ID NO: 7 расположена в положениях 1-21 (5'→3') антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от модифицированной нуклеотидной последовательности (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO: 6),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладеозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотионатную связь; и

где смысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 9), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 9), где SEQ ID NO: 9 расположена в положениях 1-21 (5'→3') антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, которая отличается не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') gscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 8),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладеозин, цитидин, гуанозин или уридин, соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фторадеозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотионатную связь; и

где антисмысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, к 3'-концу смысловой цепи или к 5' и к 3'-концу

смысловой цепи SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления направляющий лиганд, такой как  $\alpha\upsilon\beta 6$  интегрин-направляющий лиганд, может быть ковалентно связан с 5'-концом смысловой цепи, 3'-концом смысловой цепи или и с 5' и с 3'-концом смысловой цепи SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO: 7); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO: 7), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами; и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 9), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO: 6); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') gscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 8),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и

s представляет собой фосфотионатную связь.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO: 6); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') gscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 8), и

где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце и  $\alpha\upsilon\beta 6$  интегрин-направляющий лиганд, ковалентно связанный с 5'-концом.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 10),

где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

s представляет собой фосфотионатную связь, и

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин (см. табл. 6); и

где смысловая цепь, по меньшей мере, по существу комплементарна антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 10); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где а, с, g и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, s представляет собой фосфотиоатную связь, и

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин (см. табл. 6).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает

антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 10); и

смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4),

где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце и  $\alpha\upsilon\beta 6$  интегрин-направляющий лиганд, ковалентно связанный с 5'-концом.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230); или

AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

где альфа-ENaC средство РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая, по меньшей мере частично, комплементарна антисмысловой цепи; и

где все или по существу все нуклеотиды на антисмысловой цепи и на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230); или

AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

где альфа-ENaC средство РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая, по меньшей мере частично, комплементарна антисмысловой цепи;

где все или по существу все нуклеотиды на антисмысловой цепи и на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами; где смысловая цепь включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце; и

где  $\alpha\upsilon\beta 6$  интегрин-направляющий лиганд связан с 5'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает нуклеотидную последовательность, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3);

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7);

UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230); или

AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254);

где альфа-ENaC средство РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая, по меньшей мере частично, комплементарна антисмысловой цепи;

где все или по существу все нуклеотиды на антисмысловой цепи и на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами;

где смысловая цепь включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце;

где  $\alpha\upsilon\beta 6$  интегрин-направляющий лиганд связан с 5'-концом смысловой цепи; и

где соответствующая последовательность антисмысловой цепи расположена в положениях 1-21 антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где антисмысловая цепь и смысловая цепь состоят из, состоят по существу из или включают нуклеотидные последовательности, которые отличаются 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3) и  
 CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:5);  
 UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) и  
 GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9);  
 UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230) и  
 CUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:259); или  
 AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254) и  
 GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU (SEQ ID NO:289);

где все или по существу все нуклеотиды на антисмысловой цепи и на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, где антисмысловая цепь и смысловая цепь состоят из, состоят по существу из или включают нуклеотидные последовательности, которые отличаются 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG (SEQ ID NO:3) и  
 CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:5);  
 UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC (SEQ ID NO:7) и  
 GCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:9);  
 UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG (SEQ ID NO:230) и  
 CUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO:259); или  
 AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU (SEQ ID NO:254) и  
 GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU (SEQ ID NO:289);

где все или по существу все нуклеотиды на антисмысловой цепи и на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами;

где смысловая цепь включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце; и

где  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющий лиганд связан с 5'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2);  
 usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6);  
 cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10);  
 usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfsg (SEQ ID NO:107); или  
 asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152);

где а, с, г и и представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

s представляет собой фосфотиоатную связь,

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин (см. табл. 6);

где альфа-ENaC средство РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая, по меньшей мере частично, комплементарна антисмысловой цепи; и

где все или по существу все нуклеотиды на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированную нуклеотидную последовательность, которая отличается 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2);  
 usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6);  
 cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10);  
 usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfsg (SEQ ID NO:107); или  
 asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152);

где альфа-ENaC средство РНКи дополнительно включает смысловую цепь, которая, по меньшей мере частично, комплементарна антисмысловой цепи;

где все или по существу все нуклеотиды на смысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами;

где смысловая цепь включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце; и

где  $\alpha\beta\delta$  интегрин-направляющий лиганд связан с 5'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает модифицированные нуклеотидные последовательности, которые отличаются 0 или 1 нуклеотидом от одной из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) и  
 cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:4);  
 usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) и  
 gscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:8);  
 cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) и  
 cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:4);  
 usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfcAfc (SEQ ID NO:107) и  
 csugugcaaCfCfAfgaacaauca (SEQ ID NO:293); или  
 asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) и  
 gscagagCfAfGfaaugacuucuuu (SEQ ID NO:294);

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, s представляет собой фосфотиоатную связь, и cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин (см. табл. 6).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, которая состоит из, состоит по существу из или включает одну из следующих пар нуклеотидных последовательностей (5'→3'):

usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:2) и  
 cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:4);  
 usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc (SEQ ID NO:6) и  
 gscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:8);  
 cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO:10) и  
 cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO:4);  
 usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfcAfc (SEQ ID NO:107) и  
 csugugcaaCfCfAfgaacaauca (SEQ ID NO:293); или  
 asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu (SEQ ID NO:152) и  
 gscagagCfAfGfaaugacuucuuu (SEQ ID NO:294);

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, s представляет собой фосфотиоатную связь, и

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин (см. табл. 6);

где смысловая цепь включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце; и

где  $\alpha\beta\delta$  интегрин-направляющий лиганд связан с 5'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая включает последовательность нуклеиновых оснований, которая отличается 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая включает нуклеотидную последовательность, отличающуюся не больше чем 1 нуклеотидом от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO: 21), где все или по существу все нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи, раскрытое в настоящем документе, включает антисмысловую цепь, которая включает последовательность нуклеиновых оснований, отличающуюся 0 или 1 нуклеиновым основанием от нуклеотидной последовательности (5'→3') UAUUUGUUCUGGUUGCACA (SEQ ID NO: 21), где SEQ ID NO: 21 расположена в положениях 1-19 (5'→3') антисмысловой цепи.

При использовании в настоящем документе термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" означают полимер из соединенных нуклеозидов, каждый из которых может быть независимо модифицирован или не модифицирован.

При использовании в настоящем документе "средство РНКи" (также именуемое "РНКи триггером") означает композицию, которая содержит молекулу РНК или РНК-подобного (например, химически модифицированного РНК) олигонуклеотида, которая способна вызывать расщепление или ингибирование

(например, расщепляет или ингибирует при адекватных условиях) трансляции транскриптов информационной РНК (мРНК) мРНК-мишени сиквенс-специфическим образом. При использовании в настоящем документе средства РНКи могут действовать через механизм РНК-интерференции (т.е. индуцировать РНК-интерференцию при взаимодействии с аппаратом пути РНК-интерференции (РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга или RISC) клеток млекопитающих) или любой альтернативный(ые) механизм(ы) или путь(и). Хотя считается, что средства РНКи в контексте использования данного термина в настоящем документе действуют прежде всего через механизм РНК-интерференции, раскрытые средства РНКи не связаны или не ограничены каким-либо конкретным путем или механизмом действия. Средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, состоят из смысловой цепи и антисмысловой цепи и включают, без ограничения перечисленными, малые интерферирующие РНК (миРНК), двухцепочечные РНК (дцРНК), микроРНК (мкРНК), малые шпилечные РНК (мшРНК) и субстраты дайсера. Антисмысловая цепь средств РНКи, описанных в настоящем документе, по меньшей мере частично, комплементарна мРНК, служащей в качестве мишени (т.е. мРНК альфа-ЕNaС). Средства РНКи могут включать один или более модифицированных нуклеотидов и/или одну или более нефосфодиэфирных связей.

При использовании в настоящем документе термины "вызывать сайленсинг", "снижать", "ингибировать", "даунрегулировать" или "вызывать нокдаун" в отношении экспрессии данного гена означают, что экспрессия гена при измерении по уровню РНК, транскрибируемой с гена, или уровню полипептида, белка или субъединицы белка, транслируемой с мРНК в клетке, группе клеток, ткани, органе или организме субъекта, в которых транскрибируется ген, снижается при обработке клетки, группы клеток, ткани, органа или субъекта средствами РНКи, описанными в настоящем документе, по сравнению со второй клеткой, группой клеток, тканью, органом или субъектом, которые не подвергались такой обработке.

При использовании в настоящем документе термины "последовательность" и "нуклеотидная последовательность" означают последовательность или порядок нуклеиновых оснований или нуклеотидов, описанные последовательностью букв при использовании стандартной номенклатуры.

При использовании в настоящем документе "основание", "нуклеотидное основание" или "нуклеиновое основание" является гетероциклическим пиримидиновым или пуриновым соединением, которое является компонентом нуклеотида, и включает основные пуриновые основания аденин и гуанин, и основные пиримидиновые основания цитозин, тимин и урацил. Нуклеиновое основание может быть дополнительно модифицировано с включением без ограничения универсальных оснований, гидрофобных оснований, смешанных оснований, оснований увеличенного размера и фторированных оснований (см., например, *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008). Синтез таких модифицированных нуклеиновых оснований (включая фосфорамидитные соединения, которые включают модифицированные нуклеиновые основания) известен в уровне техники.

При использовании в настоящем документе, если не указано иное, термин "комплементарный", при использовании для описания первого нуклеинового основания или нуклеотидной последовательности (например, смысловой цепи средства РНКи или мРНК-мишени) в отношении второго нуклеинового основания или нуклеотидной последовательности (например, антисмысловой цепи средства РНКи или одноцепочечного антисмыслового олигонуклеотида), означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться (образовывать водородные связи пар азотистых оснований при физиологических условиях у млекопитающего (или подобных условиях *in vitro*)) и образовывать дуплекс или двуспиральную структуру в некоторых стандартных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность. Комплементарные последовательности включают Уотсон-Криковские пары азотистых оснований или не-Уотсон-Криковские пары азотистых оснований и включают природные или модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов, по меньшей мере, до такой степени, что выполняются вышеуказанные требования гибридизации. Идентичность или комплементарность последовательности не зависит от модификации. Например, а и Af, как определено в настоящем документе, комплементарны U (или T) и идентичны A в рамках определения идентичности или комплементарности.

При использовании в настоящем документе "совершенно комплементарный" или "полностью комплементарный" означает, что в гибридизованной паре молекул последовательностей нуклеиновых оснований или нуклеотидов все (100%) основания в непрерывной последовательности первого олигонуклеотида гибридизуются с тем же количеством оснований в непрерывной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем документе "частично комплементарный" означает, что в гибридизованной паре молекул последовательностей нуклеиновых оснований или нуклеотидов по меньшей мере 70% оснований, но не все, в непрерывной последовательности первого олигонуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может включить всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем документе "по существу комплементарный" означает, что в гибридизованной паре молекул последовательностей нуклеиновых оснований или нуклеотидов по меньшей

мере 85% оснований, но не все, в непрерывной последовательности первого олигонуклеотида будут гибридизоваться с таким же количеством оснований в непрерывной последовательности второго олигонуклеотида. Непрерывная последовательность может включать всю или часть первой или второй нуклеотидной последовательности.

При использовании в настоящем документе термины "комплементарный", "полностью комплементарный", "частично комплементарный" и "по существу комплементарный" используются в отношении соответствия нуклеиновых оснований или нуклеотидов между смысловой цепью и антисмысловой цепью средства РНКи или между антисмысловой цепью средства РНКи и последовательностью мРНК альфа-ЕNaС.

При использовании в настоящем документе термины "по существу идентичная" или "существенная идентичность" применительно к последовательности нуклеиновой кислоты означают, что нуклеотидная последовательность (или часть нуклеотидной последовательности) обладает по меньшей мере приблизительно 85% идентичностью последовательности или больше, например по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью, по сравнению с референсной последовательностью. Процент идентичности последовательности определяют при сравнении двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения. Процент вычисляют путем определения количества положений, в которых в обеих последовательностях присутствует один и тот же тип основания нуклеиновой кислоты, с получением количества совпадающих положений, деления количества совпавших положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. Изобретения, раскрытые в настоящем документе, охватывают нуклеотидные последовательности, по существу идентичные последовательностям, раскрытым в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе термины "лечить", "лечение" и т.п. означают способы или этапы, применяемые для облегчения или снижения количества, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта. При использовании в настоящем документе "лечить" и "лечение" могут включать превентивное лечение, контроль, профилактическое лечение и/или ингибирование или снижение количества, тяжести и/или частоты одного или более симптомов заболевания у субъекта.

При использовании в настоящем документе фраза "введение в клетку" в отношении средства РНКи означает функциональную доставку средства РНКи в клетку. Фраза "функциональная доставка" означает доставку средства РНКи в клетку таким способом, который позволяет средству РНКи проявлять ожидаемую биологическую активность, например сиквенс-специфическое ингибирование экспрессии гена.

Если не указано иное, использование символа  в рамках настоящего документа означают, что любая группа или группы могут быть связаны с ним, что находится в соответствии с объемом изобретения, описанного в настоящем документе.

При использовании в настоящем документе термин "изомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но отличаются по свойствам, или последовательности связывания их атомов, или по расположению их атомов в пространстве. Изомеры, которые отличаются по расположению их атомов в пространстве, называются "стереоизомерами". Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются "диастереомерами", а стереоизомеры, которые являются несовпадающими при наложении зеркальными отображениями, называются "энантиомерами" или иногда оптическими изомерами. Атом углерода, связанный с четырьмя неидентичными заместителями, называется "хиральным центром".

При использовании в настоящем документе, если специально не определено, что структура имеет конкретную конформацию для каждой структуры, в которой присутствуют асимметричные центры и, таким образом, приводят к энантиомерам, диастереомерам или другим стереоизомерным конфигурациям, каждая структура, раскрытая в настоящем документе, должна представлять все такие возможные изомеры, включая их оптически чистые и рацемические формы. Например, структуры, раскрытые в настоящем документе, должны охватывать смеси диастереомеров, а также отдельные стереоизомеры.

При использовании в пункте формулы изобретения в настоящем документе фраза "состоящий из" исключает какой-либо элемент, этап или компонент, не указанный в пункте формулы. При использовании в пункте формулы изобретения в настоящем документе фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем пункта формулы указанными материалами или этапами и теми, которые не оказывают существенного влияния на основное(ые) и новое(ые) свойство(а) заявленного изобретения.

Средний специалист в данной области с легкостью сумеет понять и оценить, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут содержать некоторые атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии в зависимости от среды, в которую помещено соединение или композиция. Таким образом, в рамках настоящего документа структуры, раскрытые в настоящем документе, предусматривают, что некоторые функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированными или депротонированными. Предполагается, что описание, представленное в настоящем документе, охватывает раскрытые соединения и композиции независимо от их состояния протонирования в зависимости от окружающей среды (например, pH), как бу-

дет очевидно среднему специалисту в данной области.

При использовании в настоящем документе термин "соединенный" или "конъюгированный" в отношении связи между двумя соединениями или молекулами означает, что два соединения или две молекулы соединены ковалентной связью. Если не указано иное, термины "соединенный" и "конъюгированный" в рамках настоящего документа могут относиться к связи между первым соединением и вторым соединением с или без каких-либо промежуточных атомов или групп атомов.

При использовании в настоящем документе термин "включающий" используется в значении и попеременно с фразой "включающий, но не ограниченный". Термин "или" используется в настоящем документе в значении и попеременно с термином "и/или", если из контекста прямо не следует иное.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалистам в данной области. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие источники, указанные в настоящем документе, включены посредством отсылки во всей своей полноте. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие объекты, признаки, аспекты и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания, сопровождающих фигур и из формулы изобретения.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Гистограмма, на которой показана относительная полная экспрессия мышинового альфа-ENaC в легких после введения различных альфа-ENaC средств РНКи по сравнению с контролем растворителем.

Фиг. 2. Гистограмма, на которой показана относительная полная экспрессия мышинового альфа-ENaC в легких после введения альфа-ENaC средств РНКи AD04025 и AD04858 по сравнению с контролем растворителем.

Фиг. 3. График, на котором показана относительная экспрессия крысиного альфа-ENaC в легких альфа-ENaC средств РНКи AD04025 и AD04025-конъюгата (т.е. AD04025, конъюгированного с лигандом на основе пептида, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток).

Фиг. 4. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM2.

Фиг. 5. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM1.

Фиг. 6. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM6.1.

Фиг. 7. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM9.

Фиг. 8. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM6.

Фиг. 9. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM8.

Фиг. 10. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM10.

Фиг. 11. Представление химической структуры тридентатного лиганда, направленного на  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, указанного в настоящем документе как Tri-SM11.

Фиг. 12A. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05453 (см. табл. 3-5), показанных с аминокислотной группой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами.

На фиг. 12A-12G используются следующие сокращения:

a, c, g и u являются 2'-О-метил-модифицированными нуклеотидами,

Af, Cf, Gf и Uf являются 2'-фтор-модифицированными нуклеотидами,

r является фосфодиэфирной связью,

s является фосфотиоатной связью,

invAb является инвертированным абазическим остатком,

cPrp является 5'-концевой циклопропилфосфонатной группой (см. табл. 6),

NH2-C6 является аминокислотной группой C6 (см. табл. 6), и

TriAlk14 является триалкиновым линкером, имеющим структуру, представленную в настоящем документе (см. табл. 6).

Фиг. 12B. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05924 (см. табл. 3-5), показанного функционализированным триалкиновой группой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами. Как опи-

сано в настоящем документе, AD05453 и AD05924 имеют такие же модифицированные нуклеотидные последовательности и представляют собой альтернативные подходы к синтезу конъюгата альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе.

Фиг. 12С. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05625 (см. табл. 3-5), показанного функционализированным аминогруппой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами.

Фиг. 12D. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05347 (см. табл. 3-5), показанного функционализированным аминогруппой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами.

Фиг. 12E. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05831 (см. табл. 3-5), показанного функционализированным аминогруппой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами.

Фиг. 12F. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи AD05833 (см. табл. 3-5), показанного функционализированным аминогруппой на 5'-конце смысловой цепи для облегчения связывания с направляющими лигандами.

Фиг. 12G. Схематическая диаграмма модифицированных смысловой и антисмысловой цепей и альфа-ENaC средства РНКи AD05453 и альфа-ENaC средства РНКи AD05924 (см. табл. 3-5), где X представляет собой тридентатный  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющий лиганд (включающий любые линкеры).

Фиг. 12H. Схематическая диаграмма примера конъюгата тридентатного  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющего лиганда-средства РНКи, описанного в настоящем документе, где тридентатный  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющий лиганд конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. Как показано на фигуре, каждый  $\alpha\beta6$  представляет собой  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющее соединение.

Фиг. 13A-13D. Представление химической структуры альфа-ENaC средства РНКи AD05453, включающего NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> концевую аминогруппу, показанного в виде натриевой соли.

Фиг. 14A-14D. Представление химической структуры альфа-ENaC средства РНКи AD05924, включающего триалкин-функционализированную линкерную группу (TriAlk14), показанного в виде натриевой соли.

Фиг. 15A-15E. Представление химической структуры альфа-ENaC средства РНКи AD05453, показанного в виде конъюгата Tri-SM6.1, в виде натриевой соли. Как обсуждается в настоящем документе, такую же химическую структуру можно синтезировать при использовании триалкин-функционализированной линкерной группы (TriAlk14), которая может быть присоединена с помощью фосфорамидитного синтеза, как представлено в модифицированной нуклеотидной последовательности смысловой цепи для альфа-ENaC средства РНКи AD05924 (т.е. AM07807-SS в табл. 4).

Фиг. 16A-16D. Представление химической структуры альфа-ENaC средства РНКи AD05453, включающего NH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> концевую функционализированную аминогруппу, показанного в виде свободной кислоты.

### Подробное описание

#### Средства РНКи.

В настоящем документе описаны средства РНКи для ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC (т.е. SCNN1A) (именуемые в настоящем документе как альфа-ENaC средства РНКи или альфа-ENaC РНКи триггеры). Каждое альфа-ENaC средство РНКи включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут иметь длину 16-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи могут иметь длину 17-26 нуклеотидов. Смысловая и антисмысловая цепи могут иметь одинаковую длину, или они могут иметь разную длину. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 17-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи независимо имеют длину 17-21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину 21-26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину 21-24 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину приблизительно 19 нуклеотидов, тогда как антисмысловая цепь имеет длину приблизительно 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину приблизительно 21 нуклеотид, тогда как антисмысловая цепь имеет длину приблизительно 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи имеют длину 21 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи средства РНКи независимо имеют длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечное средство РНКи имеет длину дуплекса приблизительно 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления область полной, существенной или частичной комплементарности между смысловой цепью и антисмысловой цепью имеет длину 16-26 (например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или 26) нуклеотидов и присутствует на или вблизи от 5'-конца антисмысловой цепи (например, эта область может быть отделена от 5'-конца антисмысловой цепи 0, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидами, которые не являются полностью, существенно или частично комплементарными).

Каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь содержат основной участок (также именуемый в настоящем документе как "основная последовательность" или "последовательность основного участка"), который имеет длину 16-23 нуклеотида. Основной участок антисмысловой цепи на 100% (полностью) комплементарен или по меньшей мере на 85% (существенно) комплементарен нуклеотидной последовательности (иногда именуемой, например, последовательностью-мишенью), присутствующей в альфа-ENaC-мишени. Основной участок смысловой цепи на 100% (полностью) комплементарен или по меньшей мере на 85% (существенно) комплементарен основному участку на антисмысловой цепи и, таким образом, основной участок смысловой цепи, как правило, полностью идентичен или по меньшей мере на 85% идентичен нуклеотидной последовательности (последовательности-мишени), присутствующей в альфа-ENaC мРНК-мишени. Основной участок смысловой цепи может иметь такую же длину, как соответствующий антисмысловой основной участок, или он может иметь другую длину. В некоторых вариантах осуществления основной участок антисмысловой цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления основной участок смысловой цепи имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида.

Примеры нуклеотидных последовательностей, используемых при формировании альфа-ENaC средств РНКи, представлены в табл. 2, 3 и 4. Примеры дуплексов средств РНКи, которые включают нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи в табл. 2, 3 и 4, показаны в табл. 5.

Смысловые и антисмысловые цепи альфа-ENaC средства РНКи отжигаются с образованием дуплекса. Смысловая цепь и антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи могут быть частично, существенно или полностью комплементарны друг другу. В комплементарной дуплексной области последовательность основного участка смысловой цепи по меньшей мере на 85% комплементарна или на 100% комплементарна последовательности основного участка антисмысловой. В некоторых вариантах осуществления последовательность основного участка смысловой цепи содержит последовательность из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23 нуклеотидов, которые по меньшей мере на 85 или 100% комплементарны соответствующим последовательности из 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотидов последовательности основного участка антисмысловой цепи (т.е. последовательности основного участка смысловой и антисмысловой цепей альфа-ENaC средства РНКи имеют область из по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22 или по меньшей мере 23 нуклеотидов, основания которой спарены по меньшей мере на 85 или на 100%.)

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловых цепей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловых цепей в табл. 2 или 4.

Смысловая цепь и/или антисмысловая цепь могут необязательно и независимо содержать еще 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов (выступающий участок) на 3'-конце, 5'-конце или на 3' и на 5'-концах последовательностей основных участков. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если таковые присутствуют, могут быть или могут не быть комплементарными соответствующей последовательности в мРНК альфа-ENaC. Дополнительные нуклеотиды смысловой цепи, если таковые присутствуют, могут быть или могут не быть идентичными соответствующей последовательности в мРНК альфа-ENaC. Дополнительные нуклеотиды антисмысловой цепи, если таковые присутствуют, могут быть или могут не быть комплементарными соответствующим дополнительным нуклеотидам смысловой цепи, если таковые присутствуют.

При использовании в настоящем документе выступающий участок включает 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов на 5' и/или 3'-конце последовательности основного участка смысловой цепи и/или последовательности основного участка антисмысловой цепи. Выступающие нуклеотиды на смысловой цепи могут быть или могут не быть комплементарными нуклеотидам, будь то нуклеотиды последовательности основного участка или выступающие нуклеотиды, на соответствующей антисмысловой цепи. С другой стороны выступающие нуклеотиды на антисмысловой цепи могут быть или могут не быть комплементарными нуклеотидам, будь то нуклеотиды основного участка или выступающие нуклеотиды, на соответствующей смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления и смысловая цепь, и антисмысловая цепь средства РНКи содержат 3' и 5'-выступающие участки. В некоторых вариантах осуществления один или более 3'-выступающих нуклеотидов на одной цепи образуют пары оснований с одним или более 5'-выступающими нуклеотидами другой цепи. В других вариантах осуществления один или более 3'-выступающих нуклеотидов одной цепи не образуют пары оснований с одним или более 5'-выступающими нуклеотидами другой цепи. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи имеет антисмысловую цепь, имеющую 3'-выступающий участок, и смысловую цепь, имеющую 5'-выступающий участок. В некоторых вариантах осуществления выступающий(ие) нуклеотид(ы) не спарен(ы) и формирует(ют) выступающий конец. При использовании в настоящем документе "выступающий конец" относится к участку из одного или более неспаренных нуклеотидов, расположенных на

конце смысловой цепи или антисмысловой цепи, который не является частью гибридованной или двуспиральной части средства РНК, раскрытого в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕNaС средство РНК включает антисмысловую цепь, имеющую 3'-выступающий участок длиной 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В других вариантах осуществления альфа-ЕNaС средство РНК включает антисмысловую цепь, имеющую 3'-выступающий участок длиной 1, 2 или 3 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более выступающих нуклеотидов антисмысловой цепи включают нуклеотиды урацил, или тимидин, или нуклеотиды, которые комплементарны соответствующей последовательности мРНК альфа-ЕNaС.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец антисмысловой цепи может включать дополнительные абазические остатки (Ab). "Абазический остаток", или "абазический участок", представляет собой нуклеотид или нуклеозид, который не имеет нуклеинового основания в 1'-положении сахарной группы (см., например, патент США 5998203). В некоторых вариантах осуществления Ab или AbAb могут быть добавлены на 3'-конец антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления абазический(ие) остаток(и) может(могут) быть добавлен(ы) в виде инвертированных абазических остатков (invAb) (см. табл. 6) (см., например, F. Czauderna, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(11), 2705-16).

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь или антисмысловая цепь могут включать "концевой кэп", который в рамках настоящего документа представляет собой нуклеотидное соединение или другой фрагмент, который может быть включен на один или более концов цепи средства РНК, раскрытого в настоящем документе, и может давать средство РНК, обладающее в некоторых случаях определенными полезными свойствами, такими как, например, обеспечивать защиту от расщепления экзонуклеазами. Концевые кэпы общеизвестны в уровне техники и включают инвертированные абазические остатки, а также углеродные цепи, такие как концевые C3, C6 или C12 группы. В некоторых вариантах осуществления концевой кэп присутствует на 5'-конце, 3'-конце или на 5' и 3'-концах смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕNaС средство РНК включает смысловую цепь, имеющую 3'-выступающий участок длиной 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более выступающих нуклеотидов смысловой цепи включают нуклеотиды аденозин, урацил или тимидин, АТ динуклеотид или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК альфа-ЕNaС. В некоторых вариантах осуществления 3'-выступающий участок смысловой цепи включает или состоит из одной из следующих последовательностей, но не ограничивается ими: T, UT, TT, UU, UUT, TTT или TTTT (все приведены в направлении 5'→3').

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи может включать дополнительные абазические остатки. В некоторых вариантах осуществления UUAb, UAb или Ab добавлены на 3'-конец смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков (invAb) добавлены на 3'-конец смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков или инвертированных абазических участков встроены между направляющим лигандом и последовательностью нуклеиновых оснований смысловой цепи средства РНК. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных абазических остатков или инвертированных абазических участков на или вблизи от конца или концов смысловой цепи средства РНК обеспечивает улучшенную активность или другие требуемые свойства средства РНК.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕNaС средство РНК включает смысловую цепь, имеющую 5'-выступающий участок длиной 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления один или более выступающих нуклеотидов смысловой цепи включают нуклеотиды урацил, или аденозин, или нуклеотиды, которые соответствуют нуклеотидам в последовательности мРНК альфа-ЕNaС. В некоторых вариантах осуществления 5'-выступающий участок смысловой цепи является одной из следующих последовательностей, но не ограничен ими: CA, AUAGGC, AUAGG, AUAG, AUA, A, AA, AC, GCA, GGCA, GGC, UAUCA, UAUC, UCA, UAU, U, UU (все приведены в направлении 5'→3'). Смысловая цепь может иметь 3'-выступающий участок и/или 5'-выступающий участок.

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой цепи может включать один или более дополнительных абазических остатков (например, (Ab) или (AbAb)). В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков (invAb) добавлены на 5'-конец смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более инвертированных абазических остатков могут быть встроены между направляющим лигандом и последовательностью нуклеиновых оснований смысловой цепи средства РНК. В некоторых вариантах осуществления включение одного или более инвертированных абазических остатков на или вблизи от конца или концов смысловой цепи средства РНК может обеспечивать улучшенную активность или другие требуемые свойства средства РНК. В некоторых вариантах осуществления абазический остаток (дезоксирибозы) может быть заменен остатком рибита (абазическим остатком рибозы).

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец последовательности основного участка антисмы-

словой цепи или 3'-конец последовательности антисмысловой цепи могут включать инвертированный абазический остаток (invAb (см. табл. 6)).

Примеры последовательностей, используемых при формировании альфа-ENaC средств РНКи, представлены в табл. 2, 3 и 4. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17, 2-15, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24 или 2-24 любой из последовательностей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-18, 1-19, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 2-19, 2-20, 2-21, 2-22, 2-23, 2-24, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-24, 4-21, 4-22, 4-23, 4-24, 5-22, 5-23 или 5-24 любой из последовательностей в табл. 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи средств РНКи, описанных в настоящем документе, содержат одинаковое количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи средств РНКи, описанных в настоящем документе, содержат разное количество нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи средства РНКи формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления, 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи средства РНКи формируют тупой конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца средства РНКи формируют тупые концы. В некоторых вариантах осуществления ни один из концов средства РНКи не является тупым. При использовании в настоящем документе "тупой конец" относится к концу двухцепочечного средства РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух отоженных цепей комплементарны (образуют комплементарную пару оснований).

В некоторых вариантах осуществления 5'-конец смысловой цепи и 3'-конец антисмысловой цепи средства РНКи формируют неспаренный конец. В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи средства РНКи формируют неспаренный конец. В некоторых вариантах осуществления оба конца средства РНКи формируют неспаренный конец. В некоторых вариантах осуществления ни один конец средства РНКи не является неспаренным концом. При использовании в настоящем документе неспаренный конец относится к концу двухцепочечного средства РНКи, в котором концевые нуклеотиды двух отоженных цепей формируют пару (т.е. не образуют выступающий конец), но не являются комплементарными (т.е. образуют некомплеметарную пару). В некоторых вариантах осуществления один или более неспаренных нуклеотидов на конце одной цепи двухцепочечного средства РНКи образуют выступающий конец. Неспаренные нуклеотиды могут быть на смысловой цепи или антисмысловой цепи, создавая 3' или 5'-выступающий конец. В некоторых вариантах осуществления средство РНКи содержит тупой конец и неспаренный конец, тупой конец и 5'-выступающий конец, тупой конец и 3'-выступающий конец, неспаренный конец и 5'-выступающий конец, неспаренный конец и 3'-выступающий конец, два 5'-выступающих конца, два 3'-выступающих конца, 5'-выступающий конец и 3'-выступающий конец, два неспаренных конца или два тупых конца. Как правило, в случае присутствия выступающие концы расположены на 3'-концах смысловой цепи, антисмысловой цепи или и на смысловой цепи, и на антисмысловой цепи.

Модифицированные нуклеотиды при использовании в различных полинуклеотидных или олигонуклеотидных конструкциях могут сохранять активность соединения в клетках с одновременным повышением стабильности этих соединений в сыворотке и могут также сводить к минимуму возможность активации активности интерферонов у людей при введении полинуклеотидной или олигонуклеотидной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи получены или предоставлены в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи получено в виде натриевой соли. Такие формы, которые известны в уровне техники, включены в объем изобретения, раскрытого в настоящем документе.

Модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов. При использовании в настоящем документе "модифицированный нуклеотид" является нуклеотидом, отличным от рибонуклеотида (2'-гидроксил-нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами.

При использовании в настоящем документе модифицированные нуклеотиды могут включать, без ограничения перечисленным, дезоксирибонуклеотиды, миметики нуклеотидов, абазические нуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как Ab), 2'-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды с 3'-3' связями (инвертированные) (обозначенные в настоящем документе как invdN, invN, invn), нуклеотиды с модифицированным нуклеиновым основанием, мостиковые нуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (ПНК), 2',3'-секонуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеиновых оснований, обозначенные в настоящем документе как N<sub>UNA</sub> или NUNA), закрытые нуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как N<sub>LNA</sub> или NLNA), 3'-O-метокси (связанные 2' межнуклеозидными связями) нуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как 3'-OMen), 2'-F-арабино-нуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как NfANA или Nf<sub>ANA</sub>), 5'-Me, 2'-фтор-нуклеотид (обозначенный в настоящем документе как 5Me-Nf), морфолино-нуклеотиды, винилфосфонат-дезоксирибонуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как vpdN), винилфосфонатсодержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонатсодержащие нуклеотиды (сPrpN). 2'-Модифицированные нуклеотиды (т.е. нуклеотид с другой группой кроме гидроксильной группы в 2'-положении пятичленного кольца сахара), включая без ограничения 2'-О-метилнуклеотиды (обозначенные в настоящем документе подстрочной буквой 'n' в нуклеотидной последовательности), 2'-дезоксид-2'-фтор-нуклеотиды (также указанные в настоящем документе как 2'-фтор-нуклеотид и обозначенные в настоящем документе как Nf), 2'-дезоксид-нуклеотиды (обозначенные в настоящем документе как dN), 2'-метоксиэтил (2'-O-2-метоксиэтил) нуклеотиды (также указанные в настоящем документе как 2'-МОЕ и обозначенные в настоящем документе как NM), 2'-амино-нуклеотиды и 2'-алкил-нуклеотиды. Не требуется, чтобы все положения в данном соединении были модифицированы одинаково. С другой стороны, в одно альфа-ENaC средство РНКи или даже в один его нуклеотид может быть включено больше одной модификации. Смысловые цепи и антисмысловые цепи альфа-ENaC средства РНКи могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в уровне техники. Модификация в одном нуклеотиде не зависит от модификации в другом нуклеотиде.

Модифицированные нуклеиновые основания включают синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины (например, 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, инозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкил (например, 6-метил, 6-этил, 6-изопропил или 6-н-бутил) производные аденина и гуанина, 2-алкил (например, 2-метил, 2-этил, 2-изопропил или 2-н-бутил) и другие алкилпроизводные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил, цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-сульфгидрил, 8-амино, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген (например, 5-бром), 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

В некоторых вариантах осуществления все или по существу все нуклеотиды средства РНКи являются модифицированными нуклеотидами. При использовании в настоящем документе средство РНКи, в котором по существу все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, является средством РНКи, содержащим четыре или меньше (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) нуклеотидов на смысловой цепи и на антисмысловой цепи, которые являются рибонуклеотидами (т.е. немодифицированными). При использовании в настоящем документе смысловая цепь, в которой по существу все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, является смысловой цепью, содержащей два или меньше (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в смысловой цепи, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. При использовании в настоящем документе антисмысловая смысловая цепь, в которой по существу все присутствующие нуклеотиды являются модифицированными нуклеотидами, является антисмысловой цепью, содержащей два или меньше (т.е. 0, 1 или 2) нуклеотидов в смысловой цепи, которые являются немодифицированными рибонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов средства РНКи являются немодифицированным рибонуклеотидом.

Модифицированные межнуклеозидные связи.

В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов альфа-ENaC средства РНКи связаны нестандартными связями или скелетами (т.е. модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными скелетами). Модифицированные межнуклеозидные связи или скелеты включают, без ограничения перечисленными, фосфотиоатные группы (обозначенные в настоящем документе подстрочной "s"), хиральные фосфотиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкил-фосфотриэфиры, алкил-фосфонаты (например, метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (например, 3'-аминофосфорамидат, аминоалкилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры, морфолино связи, боронофосфаты, имеющие обычные 3'-5' связи, 2'-5' связанные аналоги боронофосфатов или боронофосфаты с инвертированной полярностью, где смежные пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь или скелет не содержат атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, не содержащие атом

фосфора, включают, без ограничения перечисленными, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межсахарные связи, или одну или более короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межсахарных связей. В некоторых вариантах осуществления модифицированные межнуклеозидные скелеты включают, без ограничения перечисленными, силоксановые скелеты, сульфидные скелеты, сульфоксидные скелеты, сульфоновые скелеты, формацетильные и тиоформацетильные скелеты, метиленформацетильные и тиоформацетильные скелеты, алкеновые скелеты, сульфаматные скелеты, метилениминовые и метиленигидразиновые скелеты, сульфонатные и сульфониамидные скелеты, амидные скелеты и другие скелеты, содержащие смешанные N, O, S и CH<sub>2</sub> компоненты.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфотиоатных связей, антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфотиоатных связей или смысловая цепь и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфотиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатных связи, антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи может содержать 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатных связи или смысловая цепь и антисмысловая цепь независимо могут содержать 1, 2, 3 или 4 фосфотиоатных связи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи содержит по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеозидных связи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеозидных связи расположены между нуклеотидами в положениях 1-3 от 3'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления одна фосфотиоатная межнуклеозидная связь расположена на 5'-конце смысловой цепи, а другая фосфотиоатная связь расположена на 3'-конце смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеозидных связи расположены между нуклеотидами в положениях 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5 или 6-8 от 5'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи содержит четыре фосфотиоатных межнуклеозидных связи. В некоторых вариантах осуществления четыре фосфотиоатных межнуклеозидных связи расположены между нуклеотидами в положениях 1-3 от 5'-конца антисмысловой цепи и между нуклеотидами в положениях 19-21, 20-22, 21-23, 22-24, 23-25 или 24-26 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи содержит по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеозидных связи на смысловой цепи и три или четыре фосфотиоатных межнуклеозидных связи на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи содержит один или более модифицированных нуклеотидов и одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В некоторых вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид объединен с модифицированной межнуклеозидной связью.

Альфа-ENaC средства РНКи.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, направленно взаимодействуют с геном альфа-ENaC в или вблизи от положений последовательности альфа-ENaC, показанной в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, включает последовательность основного участка, которая полностью, по существу или, по меньшей мере, частично комплементарна 19-мерной последовательности-мишени альфа-ENaC, раскрытой в табл. 1.

Таблица 1

19-Мерные последовательности-мишени мРНК альфа-ENaC (взяты от альфа-субъединицы эпителиального натриевого канала 1 homo sapiens (SCNN1A), варианта транскрипта 1, GenBankNM\_001038.5 (SEQ ID NO: 1))

SEQ ID NO.	19-мерная последовательность-мишень альфа-ENaC (5'→3')	Соответствующие положения в SEQ ID NO: 1
11	UGUGCAACCAGAACAAC	972-990
12	GUGCAACCAGAACAACUCG	973-991
13	GCAGAGCAGAAUGACUUCA	1289-1307
14	AGAGCAGAAUGACUUCUUAU	1291-1309
15	CUACCAGACAUACUCAUCA	1000-1018
16	UCUACCAGACAUACUCAUC	999-1017
17	CUUUGACCUGUACAAAUAC	763-781
18	UGGAAGGACUGGAAGAUCG	944-962
19	GGAAGGACUGGAAGAUCGG	945-963
20	CUGUGCCUACAUCUUCUUAU	1579-1597

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает антисмысловую цепь, где положение 19 антисмысловой цепи (5'→3') способно образовывать пару оснований с положением 1 19-мерной последовательности-мишени, раскрытой в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство включает антисмысловую цепь, где положение 1 антисмысловой цепи (5'→3') способно образовывать пару оснований с положением 19 19-мерной последовательности-мишени, раскрытой в табл. 1.

той в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство включает антисмысловую цепь, где положение 2 антисмысловой цепи (5'→3') способно образовывать пару оснований с положением 18 19-мерной последовательности-мишени, раскрытой в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство включает антисмысловую цепь, где положения 2-18 антисмысловой цепи (5'→3') способны образовывать пару оснований с каждым из соответствующих комплементарных оснований, расположенных в положениях 18-2 19-мерной последовательности-мишени, раскрытой в табл. 1.

В отношении средств РНКи, раскрытых в настоящем документе, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) может быть полностью комплементарен гену альфа-ЕНaС или может быть некомплементарен гену альфа-ЕНaС. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) представляет собой U, A или dT. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) формирует пару оснований A:U или U:A со смысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ЕНaС РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17, 1-18 или 2-18 любой из последовательностей смысловой цепи в табл. 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство РНКи состоит из

(i) антисмысловой цепи, включающей последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловой цепи в табл. 2 или 3; и

(ii) смысловой цепи, включающей последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей смысловой цепи в табл. 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средства РНКи включают основные 19-мерные нуклеотидные последовательности, показанные в следующей табл. 2.

Таблица 2

Последовательности оснований основного участка антисмысловой цепи и смысловой цепи альфа-ЕНaС средства РНКи (N=любое нуклеиновое основание)

SEQ ID NO:	Последовательность оснований антисмысловой цепи (5'→3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO:	Последовательность оснований смысловой цепи (5'→3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	Соответствующие положения в SEQ ID NO: 1
21	UAUUUGUUCUGGUUGCACA	60	UGUGCAACCAGAACAAAUA	972-990
22	AAUUUGUUCUGGUUGCACA	61	UGUGCAACCAGAACAAAUA	972-990
23	GAUUUGUUCUGGUUGCACA	62	UGUGCAACCAGAACAAAUC	972-990
24	NAUUUGUUCUGGUUGCACA	63	UGUGCAACCAGAACAAAUN	972-990
25	NAUUUGUUCUGGUUGCACN	64	NGUGCAACCAGAACAAAUN	972-990
26	AAUGAAGUCAUUCUGCUCU	65	AGAGCAGAAUGACUUCUAU	1291-1309
27	UAUGAAGUCAUUCUGCUCU	66	AGAGCAGAAUGACUUCUAU	1291-1309
28	NAUGAAGUCAUUCUGCUCU	67	AGAGCAGAAUGACUUCUAU	1291-1309
29	NAUGAAGUCAUUCUGCUCN	68	NGAGCAGAAUGACUUCUAU	1291-1309
30	UGAUGAGUAUGUCUGGUAG	69	CUACCAGACAUACUCAUCA	1000-1018
31	NGAUGAGUAUGUCUGGUAG	70	CUACCAGACAUACUCAUCN	1000-1018
32	NGAUGAGUAUGUCUGGUAN	71	NUACCAGACAUACUCAUCN	1000-1018
33	GAUGAGUAUGUCUGGUAGA	72	UCUACCAGACAUACUCAUC	999-1017
34	UAUGAGUAUGUCUGGUAGA	73	UCUACCAGACAUACUCAUA	999-1017
35	NAUGAGUAUGUCUGGUAGA	74	UCUACCAGACAUACUCAUN	999-1017
36	NAUGAGUAUGUCUGGUAGN	75	NCUACCAGACAUACUCAUN	999-1017
37	CGAUUUGUUCUGGUUGCAC	76	GUGCAACCAGAACAAAUCG	973-991
38	UGAUUUGUUCUGGUUGCAC	77	GUGCAACCAGAACAAAUCA	973-991
39	NGAUUUGUUCUGGUUGCAC	78	GUGCAACCAGAACAAAUCN	973-991
40	NGAUUUGUUCUGGUUGCAN	79	NUGCAACCAGAACAAAUCN	973-991
41	GUUUUUGUACAGGUCAAAG	80	CUUUGACCUGUACAAAUAU	763-781
42	UUUUUUGUACAGGUCAAAG	81	CUUUGACCUGUACAAAUAU	763-781
43	NUUUUUGUACAGGUCAAAG	82	CUUUGACCUGUACAAAUAN	763-781
44	NUUUUUGUACAGGUCAAAN	83	NUUUGACCUGUACAAAUAN	763-781
45	CGAUCUCCAGUCCUCCA	84	UGGAAGGACUGGAAGAUCG	944-962
46	UGAUCUCCAGUCCUCCA	85	UGGAAGGACUGGAAGAUCA	944-962
47	NGAUCUCCAGUCCUCCA	86	UGGAAGGACUGGAAGAUCN	944-962
48	NGAUCUCCAGUCCUCCN	87	NGGAAGGACUGGAAGAUCN	944-962
49	CCGAUCUCCAGUCCUCC	88	GGAAGGACUGGAAGAUCGG	945-963
50	UCGAUCUCCAGUCCUCC	89	GGAAGGACUGGAAGAUCGA	945-963
51	NCGAUCUCCAGUCCUCC	90	GGAAGGACUGGAAGAUCGN	945-963
52	NCGAUCUCCAGUCCUCCN	91	NGAAGGACUGGAAGAUCGN	945-963
53	UGAAGUCAUUCUGCUCUGC	92	GCAGAGCAGAAUGACUUCUA	1289-1307
54	NGAAGUCAUUCUGCUCUGC	93	GCAGAGCAGAAUGACUUCN	1289-1307
55	NGAAGUCAUUCUGCUCUGN	94	NCAGAGCAGAAUGACUUCN	1289-1307
56	AUAGAAGAUGUAGGCACAG	95	CUGUGCCUACAUCUUCUUAU	1579-1597
57	UUAGAAGAUGUAGGCACAG	96	CUGUGCCUACAUCUUCUUA	1579-1597
58	NUAGAAGAUGUAGGCACAG	97	CUGUGCCUACAUCUUCUAN	1579-1597
59	NUAGAAGAUGUAGGCACAN	98	NUGUGCCUACAUCUUCUAN	1579-1597

Смысловые цепи и антисмысловые цепи альфа-ЕНaС средства РНКи, которые включают или состо-

ят из нуклеотидных последовательностей в табл. 2, может быть модифицированными нуклеотидами или немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, имеющие последовательности смысловой и антисмысловой цепи, которые включают или состоят из любой из нуклеотидных последовательностей в табл. 2, представляют собой все или по существу все модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловых цепей в табл. 2. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловых цепей в табл. 2.

При использовании в настоящем документе каждый N, перечисленный в последовательности, раскрытой в табл. 2, может быть независимо выбран из любых возможных нуклеиновых оснований (включая нуклеиновые основания, присутствующие в модифицированных и немодифицированных нуклеотидах). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид N, перечисленный в последовательности, раскрытой в табл. 2, имеет нуклеиновое основание, которое комплементарно нуклеотиду N в соответствующем положении в другой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид N, перечисленный в последовательности, раскрытой в табл. 2, имеет нуклеиновое основание, которое не комплементарно нуклеотиду N в соответствующем положении в другой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид N, перечисленный в последовательности, раскрытой в табл. 2, имеет нуклеиновое основание, которое является таким же, как нуклеотид N в соответствующем положении в другой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид N, перечисленный в последовательности, раскрытой в табл. 2, имеет нуклеиновое основание, которое отличается от нуклеотида N в соответствующем положении в другой цепи.

Некоторые смысловые и антисмысловые цепи модифицированных альфа-ENaC средств РНКи представлены в табл. 3 и 4. Модифицированные антисмысловые цепи альфа-ENaC средства РНКи, а также их исходные немодифицированные последовательности нуклеиновых оснований, представлены в табл. 3. Модифицированные смысловые цепи альфа-ENaC средства РНКи, а также их исходные немодифицированные последовательности нуклеиновых оснований, представлены в табл. 4. При формировании альфа-ENaC средств РНКи каждый из нуклеотидов в каждой из исходных последовательностей оснований, перечисленных в табл. 3 и 4, а также в табл. 2 выше, может быть модифицированным нуклеотидом.

Альфа-ENaC средства РНКи, описанные в настоящем документе, образуются при отжиге антисмысловой цепи со смысловой цепью. Смысловая цепь, содержащая последовательность, перечисленную в табл. 2 или 4, может гибридизоваться с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, перечисленную в табл. 2 или 3, если эти две последовательности содержат область по меньшей мере 85% комплементарности на протяжении непрерывной последовательности 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает нуклеотидную последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает или состоит из дуплекса, имеющего последовательности нуклеиновых оснований смысловой цепи и антисмысловой цепи любой из последовательностей в табл. 2, 3 или 4.

Примеры антисмысловых цепей, содержащих модифицированные нуклеотиды, представлены в табл. 3. Примеры смысловых цепей, содержащих модифицированные нуклеотиды, представлены в табл. 4.

В рамках табл. 3 и 4 следующие примечания используются для обозначения следующих модифицированных нуклеотидов, направляющих групп и соединительных групп:

A=аденозин-3'-фосфат,  
 C=цитидин-3'-фосфат,  
 G=гуанозин-3'-фосфат,  
 U=уридин-3'-фосфат,  
 I=инозин-3'-фосфат,  
 a=2'-О-метиладенозин-3'-фосфат,  
 as=2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат,  
 c=2'-О-метилцитидин-3'-фосфат,  
 cs=2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат,  
 g=2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат,  
 gs=2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат,  
 i=2'-О-метилюридин-3'-фосфат,  
 is=2'-О-метилюридин-3'-фосфотиоат,  
 t=2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат,  
 ts=2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат,  
 u=2'-О-метилуридин-3'-фосфат,  
 us=2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат,

Nf=любой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид,  
 Af=2'-фтораденозин-3'-фосфат,  
 Afs=2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат,  
 Cf=2'-фторцитидин-3'-фосфат,  
 Cfs=2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат,  
 Gf=2'-фторгуанозин-3'-фосфат,  
 Gfs=2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат,  
 Tf=2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфат,  
 Tfs=2'-фтор-5'-метилуридин-3'-фосфотиоат,  
 Uf=2'-фторуридин-3'-фосфат,  
 UFs=2'-фторуридин-3'-фосфотиоат,  
 dN=любой 2'-дезоксирибонуклеотид,  
 dT=2'-дезокситимидин-3'-фосфат,  
 N<sub>UNA</sub>=2',3'-секо-нуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеиновых оснований), -3'-фосфат,  
 N<sub>UNAS</sub>=2',3'-секо-нуклеотидные миметики (незакрытые аналоги нуклеиновых оснований),  
 -3'-фосфотиоат,  
 A<sub>UNA</sub>=2',3'-секо-аденозин-3'-фосфат,  
 A<sub>UNAS</sub>=2',3'-секо-аденозин-3'-фосфотиоат,  
 C<sub>UNA</sub>=2',3'-секо-цитидин-3'-фосфат,  
 C<sub>UNAS</sub>=2',3'-секо-цитидин-3'-фосфотиоат,  
 G<sub>UNA</sub>=2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфат,  
 G<sub>UNAS</sub>=2',3'-секо-гуанозин-3'-фосфотиоат,  
 U<sub>UNA</sub>=2',3'-секо-уридин-3'-фосфат,  
 U<sub>UNAS</sub>=2',3'-секо-уридин-3'-фосфотиоат,  
 a<sub>2N</sub>=см. табл. 7,  
 a<sub>2Ns</sub>=см. табл. 7,  
 pu<sub>2N</sub>=см. табл. 7,  
 pu<sub>2Ns</sub>=см. табл. 7,  
 D2us=см. табл. 7,  
 Npu=см. табл. 7,  
 Nus=см. табл. 7,  
 N<sub>LNA</sub>=закрытый нуклеотид,  
 Nf<sub>ANA</sub>=2'-F-арабино-нуклеотид,  
 NM=2'-O-(2-метоксиэтил) нуклеотид,  
 AM=2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин 3'-фосфат,  
 AMs=2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин 3'-фосфотиоат,  
 TM=2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин 3'-фосфат,  
 TMs=2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин 3'-фосфотиоат,  
 R=рибит,  
 (invdN)=любой инвертированный дезоксирибонуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид),  
 (invAb)=инвертированный (3'-3'-связанный) абазический дезоксирибонуклеотид-5'-фосфат,  
 см. табл. 7,  
 (invAb)s=инвертированный (3'-3'-связанный) абазический дезоксирибонуклеотид-5'-фосфотиоат,  
 см. табл. 7,  
 (invn)=любой инвертированный 2'-Оме нуклеотид (3'-3'-связанный нуклеотид),  
 s=фосфотиоатная связь,  
 vpdN=винилфосфонат дезоксирибонуклеотид,  
 (5Me-Nf)=5'-Me, 2'-фтор нуклеотид,  
 cPrp=циклопропилфосфонат, см. табл. 7,  
 epTcPr=см. табл. 7,  
 epTM=см. табл. 7,  
 spus=см. табл. 7,  
 (Chol-TEG)=см. табл. 7,  
 (TEG-биотин)=см. табл. 7,  
 (PEG-C3-SS)=см. табл. 7,  
 (Alk-SS-C6)=см. табл. 7,  
 (C6-SS-Alk)=см. табл. 7,  
 (C6-SS-C6)=см. табл. 7,  
 (6-SS-6)=см. табл. 7,  
 (C6-SS-Alk-Me)=см. табл. 7,  
 (NH2-C6)=см. табл. 7,  
 (TriAlk#)=см. табл. 7,

(TriAlk#)s=см. табл. 7.

Как будет понятно специалисту в данной области, если иное не указано в последовательности (как, например, фосфотиоатной связью "s"), в случае присутствия в олигонуклеотиде, нуклеотидные мономеры соединены друг с другом 5'-3'-фосфодизфирными связями. Кроме того, специалисту в данной области будет очевидно, что концевой нуклеотид на 3'-конце данной олигонуклеотидной последовательности обычно имеет гидроксильную (-OH) группу в соответствующем 3'-положении данного мономера вместо фосфатной группы ex vivo. Кроме того, специалист в данной области техники легко сумеет понять и оценить, что, хотя в фосфотиоатных химических структурах, представленных в настоящем документе, анион обычно показан на атоме серы, изобретение, раскрытое в настоящем документе, охватывает все фосфотиоатные таутомеры и/или диастереомеры (например, в которых атом серы имеет двойную связь и анион находится на атоме кислорода). Если в настоящем документе прямо не указано иное, такие представления среднего специалиста в данной области используются при описании альфа-ENaC средств РНКи и комбинаций альфа-ENaC средств РНКи, раскрытых в настоящем документе.

Некоторые примеры направляющих групп и соединительных групп, используемых в альфа-ENaC средствах РНКи, раскрытых в настоящем документе, включены в химические структуры, представленные ниже в табл. 6. Каждая смысловая цепь и/или антисмысловая цепь может содержать любые направляющие группы или соединительные группы, перечисленные в настоящем документе, а также другие направляющие или соединительные группы, конъюгированные с 5' и/или 3'-концом последовательности.

Таблица 3

Последовательности антисмысловых цепей альфа-ENaC средства РНКи

Код AS цепи	Модифицированная антисмысловая цепь (5'→3')	SEQ ID NO.	Исходная последовательность оснований (5'→3') (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	SEQ ID NO.
AM04730-AS	usAfsusuuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfcusg	99	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCUG	224
AM05080-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfcusg	100	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCUG	224
AM05081-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	6	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05082-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfagsc	101	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05083-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfausu	102	UAUUUGUUCUGGUUGCACAAU	226
AM05084-AS	vpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	103	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05085-AS	asAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfagsc	104	AAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	227
AM05772-AS	usAfsusGfaAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfsc	105	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUGC	228
AM05773-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfgUfcUfgGfuAfgAfsa	106	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGAA	229
AM05774-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfsG	107	UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG	230
AM05775-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfaAfsG	108	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAAG	231
AM05776-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgAfsG	109	UUAUUUGUACAGGUCAAAGAG	232
AM05777-AS	usAfsusGfaAfgUfcCfaUfcUfgCfuCfuGfsc	110	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUGC	228
AM05778-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfcUfgUfcUfgGfuAfgAfsa	111	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGAA	229
AM05779-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcAfsG	112	UGAUUUGUUCUGGUUGCACAG	230
AM05780-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfaAfsG	113	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAAG	231
AM05781-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgAfsG	114	UUAUUUGUACAGGUCAAAGAG	232
AM05782-AS	usAfsusGfaAfgUfcCfaUfcUfgCfuCfuusu	115	UAUGAAGUCAUUCUGCUCUUU	233
AM05783-AS	usGfsasUfgAfgUfaUfcUfgUfcUfgGfuAfgusu	116	UGAUGAGUAUGUCUGGUAGUU	234
AM05784-AS	usGfsasUfuUfgUfuCfuGfgUfuGfcAfcusu	117	UGAUUUGUUCUGGUUGCACUU	235
AM05785-AS	usAfsusGfaGfuAfuGfuCfuGfgUfaGfausu	118	UAUGAGUAUGUCUGGUAGAUU	236
AM05786-AS	usUfsasUfuUfgUfaCfaGfgUfcAfaAfgusu	119	UUAUUUGUACAGGUCAAAGUU	237
AM05916-AS	cPrpusAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	120	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM05917-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	121	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM06240-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfc	122	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM06460-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfc(invAb)	123	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM06461-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	124	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7

AM06462-AS	cPrpusAfsuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	125	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM06691-AS	usGfsasUfcUfuCfcAfgUfcCfuUfcCfaGfsu	126	UGAUCUCCAGUCCUCCAGU	238
AM06693-AS	usCfsgsAfuCfuUfcCfaGfuCfcUfuCfaAfs	127	UCGAUCUCCAGUCCUCCAG	239
AM06695-AS	usGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcGfsc	128	UGAAGUCAUUCUGCUCUGCG	240
AM06697-AS	asUfsasGfaAfgAfuGfuAfgGfcAfcAfgCfsc	129	AUAGAAGAUUGAGGCACAGCC	241
AM06699-AS	usAfsusCfuUfgAfcAfgAfgGfgAfgAfcUfsc	130	UAUCGUGACAGAGGGAGACUC	242
AM06701-AS	usUfsgsAfcCfaUfcGfuGfaCfaGfaGfgfsc	131	UUGACCAUCGAGACAGAGGA	243
AM06765-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGUNACUNA	132	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	7
AM06766-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfCUNAUNA	133	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCU	244
AM06767-AS	cPrpuAfuUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfUUNAUNA	134	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGCUU	245
AM07066-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	10	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07170-AS	cPrpusAfsusUfuGfUUNA UfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	135	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07174-AS	cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsu	136	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07200-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	2	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07204-AS	usAfsusUfuGfUUNA UfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	137	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07206-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	138	UAUUUGUUCUGGUUGCACGGG	248
AM07208-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	139	UAUUUGUUCUGGUUGCACGGU	249
AM07333-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	140	UAUUUGUUCUGGUUGCACCGU	250
AM07335-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	141	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07340-AS	usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	142	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGA	251
AM07409-AS	pusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	143	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07410-AS	D2usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	144	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07411-AS	spusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	145	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07412-AS	epusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	146	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07484-AS	UUNAsAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	147	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	3
AM07485-AS	isAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg	148	IAUUUGUUCUGGUUGCACAGG	252
AM07496-AS	usAfsusUfuguucugGfuUfgCfaCfaGfsg	149	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07497-AS	usAfsusUfuguucUfgGfuUfgcaCfaGfsg	150	UAUUUGUUCUGGUUGCACAGU	247
AM07605-AS	TMsAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsc	151	TAUUUGUUCUGGUUGCACAGC	253
AM07669-AS	asGfsasAfgUfcAfuUfcUfgCfuCfuGfcusu	152	AGAAGUCAUUCUGCUCUGCUU	254

Таблица 4

## Последовательности смысловых цепей альфа-ENaC средства РНКи

Код цепи	Модифицированная смысловая цепь (5'→3')	Исходная последовательность оснований (5'→3')		
		SEQ ID NO.	SEQ ID NO. (показана как немодифицированная нуклеотидная последовательность)	
AM05073-SS	gscugugcaAfcCfaGfaacaauas(invAb)	153	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM05074-SS	gscugugcaAfcCfagaacaauas(invAb)	154	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM05075-SS	asaugugcaAfcCfagaacaauas(invAb)	295	AAUGUGCAACCAGAACAACAAUA	296
AM05077-SS	gscugugcaAfcCfagaacaauas(invAb)	155	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUU	256
AM05487-SS	(NH2-C6)sgscugugcaAfcCfagaacaauas(invAb)	156	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM05787-SS	gscagagcaGfAfaGfaucacuaas(invAb)	157	GCAGAGCAGAAUGACUUCUAU	257
AM05788-SS	usucuaccaGfAfaucacuaas(invAb)	158	UUCUACCAGACUAUCUAUCA	258
AM05789-SS	csugugcaAfcCfagaacaauas(invAb)	159	CUGUGCAACCAGAACAACAAUCA	259
AM05790-SS	csuucuaaccAfcGfAfaucacuaas(invAb)	160	CUUCUACCAGACUAUCUAUCA	260
AM05791-SS	csucuuugaCfcUfguacaauas(invAb)	161	CUCUUUGACUGUACAACAAUA	261
AM05792-SS	(invAb)AfgAfgCfaGfAfaGfaCfuUfcuauas(invAb)	162	AGAGCAGAAUGACUUCUAUUAU	262
AM05793-SS	(invAb)CfuAfcCfaGfAfaCfuUfcuauas(invAb)	163	CUACCAGACUAUCUAUCAUUAU	263
AM05794-SS	(invAb)GfuGfcAfaCfcAfgAfaCfaAfaucuaas(invAb)	164	GUGCAACCAGAACAACAAUCAU	264
AM05795-SS	(invAb)UfcUfaCfcAfgAfaCfuUfcuauas(invAb)	165	UCUACCAGACUAUCUAUCAUUAU	265
AM05796-SS	(invAb)CfuUfuGfaCfcUfgUfaCfaAfaucuaas(invAb)	166	CUUUGACUGUACAACAAUAUUAU	266
AM06162-SS	(invAb)gscugugcaAfcCfagaacaaua(invAb)	167	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM06246-SS	gcugugcaAfcCfagaacaaua(invAb)	168	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM06459-SS	gcugugcaAfcCfagaacaaua(invAb)	169	GCUGUGCAACCAGAACAACAAUA	255
AM06690-SS	(NH2-C6)sascuggaagGfAfcUfggaagacuas(invAb)	170	ACUGGAAGGACUGGAAGAUAUCA	267
AM06692-SS	(NH2-C6)scsuggaaggAfcUfggaagacuas(invAb)	171	CUGGAAGGACUGGAAGAUAUCA	268
AM06694-SS	(NH2-C6)sgscgagagCfaGfaucacuaas(invAb)	172	GCGCAGAGCAGAAUGACUUCA	269
AM06696-SS	(NH2-C6)sgscugugcUfaAfaucacuaas(invAb)	173	GGCUGGCCUACAUCUUCUAU	270
AM06698-SS	(NH2-C6)sgsagucuccUfcUfgucacuaas(invAb)	174	GAGUCUCCUCUGUCACGAUA	271
AM06700-SS	(NH2-C6)susccucugUfcAfcgaggucaas(invAb)	175	UCCUCUGUCACGAUGGUCAA	272

AM07064-SS	(NH2-C6)gscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	176	GCUGUGCAACCAGAACAAAUA	255
AM07065-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	177	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07067-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	178	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07169-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	179	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07171-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	180	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	274
AM07172-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	181	CCUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	275
AM07173-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	182	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07201-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	183	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07202-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	184	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	274
AM07203-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	185	CCUGUGCAACUAGAACAAAUA	277
AM07205-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	186	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	278
AM07207-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	187	ACCGUGCAACCAGAACAAAUA	279
AM07217-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)js(C6-SS-C6)	188	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07218-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)(C6-SS-C6)	189	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07276-SS	(TriAlk1)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	190	GCUGUGCAACCAGAACAAAUA	255
AM07280-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)s(6-SS-6)	191	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07281-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)(6-SS-6)	192	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07329-SS	(TriAlk1)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	193	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07330-SS	(TriAlk2)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	194	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07331-SS	(TriAlk3)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	195	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07332-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	196	ACGGUGCAACCAGAACAAAUA	280
AM07334-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	197	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07336-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	198	ACUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )UA	281
AM07337-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	199	ACUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	282
AM07338-SS	(NH2-C6)ascugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	200	ACUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	283
AM07339-SS	(NH2-C6)uscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	201	UCUGUGCAACCAGAACAAAUA	284
AM07341-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	202	CCUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	285
AM07342-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	203	CCUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	275
AM07343-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	204	CCUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )UA	286
AM07344-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	205	CCUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	287
AM07400-SS	(TriAlk4)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	206	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07401-SS	(TriAlk5)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	207	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07402-SS	(TriAlk6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	208	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07486-SS	(NH2-C6)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	209	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	288
AM07495-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	210	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07498-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	211	ACUGUGCAACCAGAACAAAUA	276
AM07499-SS	(NH2-C6)ascUfgUfgCfaAfCfCfagaacaauas(invAb)	212	ACUGUGCAACCAGAAC(A <sup>2N</sup> )AUA	282
AM07594-SS	(TriAlk7)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	213	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07595-SS	(TriAlk8)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	214	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07606-SS	(NH2-C6)sgscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)(C6-SS-C6)(invAb)	215	GCUGUGCAACCAGAACAAAUA	255
AM07611-SS	(TriAlk9)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	216	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07612-SS	(TriAlk10)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	217	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273
AM07665-SS	(NH2-C6)ascuggaagGfAfCfugaagauacas(invAb)	218	ACUGGAAGGACUGGAAGAUCA	267
AM07666-SS	(NH2-C6)jsscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	219	CUGUGCAACCAGAACAAAUA	259
AM07667-SS	(NH2-C6)csugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	220	CUGUGCAACCAGAACAAAUA	259
AM07668-SS	(NH2-C6)sgscagagCfAfGfaaugacuucuuus(invAb)	221	GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU	289
AM07670-SS	(NH2-C6)gscagagCfAfGfaaugacuucuuus(invAb)	222	GCAGAGCAGAAUGACUUCUUU	289
AM07807-SS	(TriAlk14)cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb)	223	CCUGUGCAACCAGAACAAAUA	273

(A<sup>2N</sup>)=нуклеотид 2-аминоаденин.

Альфа-ЕНaС средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, образуются при отжиге антисмысловой цепи со смысловой цепью. Смысловая цепь, содержащая последовательность, перечисленную в табл. 2 или 4, может гибридизоваться с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, перечисленную в табл. 2 или 3, если эти две последовательности содержат область по меньшей мере 85% комплементарности на протяжении непрерывной последовательности 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей антисмысловых цепей в табл. 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, отличается на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из последовательностей смысловых цепей в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи включает нуклеотидную последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17, 2-17, 1-18, 2-18, 1-19, 2-19, 1-20, 2-20, 1-21, 2-21, 1-22, 2-22, 1-23, 2-23, 1-24 или 2-24 любой из последовательностей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи включает или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ЕНaС средства РНКи включает нук-

леотидную последовательность любой из последовательностей в табл. 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17, 2-17, 3-17, 4-17, 1-18, 2-18, 3-18, 4-18, 1-19, 2-19, 3-19, 4-19, 1-20, 2-20, 3-20, 4-20, 1-21, 2-21, 3-21, 4-21, 1-22, 2-22, 3-22, 4-22, 1-23, 2-23, 3-23, 4-23, 1-24, 2-24, 3-24 или 4-24 любой из последовательностей в табл. 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает или состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 3.

Для средств РНКи, раскрытых в настоящем документе, нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) может быть полностью комплементарен гену альфа-ENaC или может быть некомплементарен гену альфа-ENaC. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) представляет собой U, A или dT (или модифицированный вариант U, A или dT). В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 антисмысловой цепи (в направлении 5'-конец→3'-конец) образует пару оснований A:U или U:A со смысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь альфа-ENaC средства РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловых цепей в табл. 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь альфа-ENaC РНКи включает последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей смысловых цепей в табл. 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает

- (i) антисмысловую цепь, включающую последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 2-18 или 2-19 любой из последовательностей антисмысловых цепей в табл. 2 или 3; и
- (ii) смысловую цепь, включающую последовательность нуклеотидов (в направлении 5'-конец→3'-конец) 1-17 или 1-18 любой из последовательностей смысловых цепей в табл. 2 или 4.

Смысловая цепь, содержащая последовательность, перечисленную в табл. 2 или 4, может гибридизоваться с любой антисмысловой цепью, содержащей последовательность, перечисленную в табл. 2 или 3, если эти две последовательности содержат область по меньшей мере 85% комплементарности на протяжении непрерывной последовательности 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи имеет смысловую цепь, которая состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 4, и антисмысловую цепь, которая состоит из модифицированной последовательности любой из модифицированных последовательностей в табл. 3. Некоторые репрезентативные примеры спаривания последовательностей представлены кодами дуплексов, показанными в табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает, состоит из или состоит по существу из дуплекса, представленного любым из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи состоит из любого из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе, и направляющую группу, соединительную группу и/или другую нуклеотидную группу, где направляющая группа, соединительная группа и/или другая нуклеотидная группа ковалентно соединены (т.е. конъюгированы) со смысловой цепью или антисмысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой цепи и антисмысловой цепи любого из кодов дуплексов, представленных в настоящем документе, и направляющую группу, соединительную группу и/или другую нуклеотидную группу, где направляющая группа, соединительная группа и/или другая нуклеотидная группа ковалентно соединены со смысловой цепью или антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 2 или 5, и дополнительно включает направляющую группу. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 2 или 5, и дополнительно включает один или более  $\alpha\beta\gamma\delta$  интегрин-направляющих лигандов.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 2 или 5, и дополнительно включает направляющую группу, которая является интегрин-направляющим лигандом. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство

РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 2 или 5, и дополнительно включает один или более  $\alpha\upsilon\beta\delta$  интегрин-направляющих лигандов или кластеров  $\alpha\upsilon\beta\delta$  интегрин-направляющих лигандов (например, тридентатный  $\alpha\upsilon\beta\delta$  интегрин-направляющий лиганд).

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 5.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство РНКи включает антисмысловую цепь и смысловую цепь, имеющие модифицированные нуклеотидные последовательности любого из дуплексов антисмысловой цепи/смысловой цепи из табл. 5, и дополнительно включает интегрин-направляющий лиганд.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ЕНaС средство РНКи включает, состоит из или состоит по существу из любого из дуплексов из табл. 5.

Таблица 5

Альфа-ЕНaС дуплексы средства РНКи с соответствующим смыслом и антисмысловыми идентификационными номерами цепи

Код дуплекса	Код антисмысловой цепи	Код смысловой цепи	Код дуплекса	Код антисмысловой цепи	Код смысловой цепи
AD04019	AM04730-AS	AM05073-SS	AD05121	AM06701-AS	AM06700-SS
AD04020	AM04730-AS	AM05074-SS	AD05160	AM06240-AS	AM06459-SS
AD04021	AM05080-AS	AM05074-SS	AD05161	AM06765-AS	AM06459-SS
AD04022	AM05081-AS	AM05074-SS	AD05162	AM06766-AS	AM06459-SS
AD04023	AM05082-AS	AM05074-SS	AD05163	AM06767-AS	AM06459-SS
AD04024	AM05083-AS	AM05075-SS	AD05345	AM05917-AS	AM07064-SS
AD04025	AM05084-AS	AM05074-SS	AD05346	AM07066-AS	AM07065-SS
AD04026	AM05085-AS	AM05077-SS	AD05347	AM07066-AS	AM07067-SS
AD04526	AM05772-AS	AM05787-SS	AD05426	AM07066-AS	AM07169-SS
AD04527	AM05773-AS	AM05788-SS	AD05427	AM07170-AS	AM07065-SS
AD04528	AM05774-AS	AM05789-SS	AD05428	AM07066-AS	AM07171-SS
AD04529	AM05775-AS	AM05790-SS	AD05429	AM07066-AS	AM07172-SS
AD04530	AM05776-AS	AM05791-SS	AD05430	AM07174-AS	AM07173-SS
AD04531	AM05777-AS	AM05792-SS	AD05453	AM07200-AS	AM07067-SS
AD04532	AM05778-AS	AM05793-SS	AD05454	AM07200-AS	AM07201-SS
AD04533	AM05779-AS	AM05794-SS	AD05455	AM07200-AS	AM07202-SS
AD04534	AM05780-AS	AM05795-SS	AD05456	AM07200-AS	AM07203-SS
AD04535	AM05781-AS	AM05796-SS	AD05457	AM07204-AS	AM07067-SS
AD04536	AM05782-AS	AM05792-SS	AD05458	AM07206-AS	AM07205-SS
AD04537	AM05783-AS	AM05793-SS	AD05459	AM07208-AS	AM07207-SS
AD04538	AM05784-AS	AM05794-SS	AD05471	AM07066-AS	AM07217-SS
AD04539	AM05785-AS	AM05795-SS	AD05472	AM07066-AS	AM07218-SS
AD04540	AM05786-AS	AM05796-SS	AD05473	AM07200-AS	AM07217-SS
AD04835	AM05917-AS	AM05487-SS	AD05474	AM07200-AS	AM07218-SS
AD04858	AM05917-AS	AM05074-SS	AD05515	AM05081-AS	AM07276-SS
AD04859	AM06240-AS	AM06162-SS	AD05548	AM07200-AS	AM07280-SS
AD04976	AM06460-AS	AM06459-SS	AD05549	AM07200-AS	AM07281-SS
AD04977	AM06461-AS	AM06459-SS	AD05558	AM07200-AS	AM07329-SS
AD04978	AM05916-AS	AM06459-SS	AD05559	AM07200-AS	AM07330-SS
AD04979	AM06462-AS	AM06459-SS	AD05560	AM07200-AS	AM07331-SS
AD04980	AM06462-AS	AM06246-SS	AD05561	AM07333-AS	AM07332-SS
AD05116	AM06691-AS	AM06690-SS	AD05562	AM07335-AS	AM07334-SS
AD05117	AM06693-AS	AM06692-SS	AD05563	AM07335-AS	AM07336-SS
AD05118	AM06695-AS	AM06694-SS	AD05564	AM07335-AS	AM07337-SS

AD05119	AM06697-AS	AM06696-SS	AD05565	AM07335-AS	AM07338-SS
AD05120	AM06699-AS	AM06698-SS	AD05566	AM07340-AS	AM07339-SS
AD05567	AM07200-AS	AM07341-SS	AD05686	AM07497-AS	AM07334-SS
AD05568	AM07200-AS	AM07172-SS	AD05687	AM07496-AS	AM07498-SS
AD05569	AM07200-AS	AM07342-SS	AD05688	AM07174-AS	AM07337-SS
AD05570	AM07200-AS	AM07343-SS	AD05689	AM07335-AS	AM07499-SS
AD05571	AM07200-AS	AM07344-SS	AD05690	AM07496-AS	AM07499-SS
AD05611	AM07200-AS	AM07400-SS	AD05691	AM07497-AS	AM07337-SS
AD05612	AM07200-AS	AM07401-SS	AD05757	AM07200-AS	AM07594-SS
AD05613	AM07200-AS	AM07402-SS	AD05758	AM07200-AS	AM07595-SS
AD05618	AM07409-AS	AM07067-SS	AD05772	AM07605-AS	AM05487-SS
AD05619	AM07410-AS	AM07067-SS	AD05773	AM05081-AS	AM07606-SS
AD05622	AM07411-AS	AM07067-SS	AD05778	AM07200-AS	AM07611-SS
AD05623	AM07412-AS	AM07067-SS	AD05779	AM07200-AS	AM07612-SS
AD05625	AM05081-AS	AM05487-SS	AD05829	AM06691-AS	AM07665-SS
AD05671	AM07484-AS	AM07067-SS	AD05830	AM05774-AS	AM07666-SS
AD05672	AM07485-AS	AM07067-SS	AD05831	AM05774-AS	AM07667-SS
AD05673	AM07485-AS	AM07486-SS	AD05832	AM07669-AS	AM07668-SS
AD05683	AM07174-AS	AM07334-SS	AD05833	AM07669-AS	AM07670-SS
AD05684	AM07335-AS	AM07495-SS	AD05924	AM07200-AS	AM07807-SS
AD05685	AM07496-AS	AM07495-SS			

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи получено или предоставлено в виде соли, смешанной соли или свободной кислоты. Средства РНКи, описанные в настоящем документе, после доставки в клетку, экспрессирующую ген альфа-ENaC, ингибируют или вызывают нокдаун экспрессии одного или более генов альфа-ENaC *in vivo* и/или *in vitro*.

Направляющие группы, соединительные группы, модуляторы фармакокинетики (ФК) и носители для доставки.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи содержит или конъюгировано с одной или более нуклеотидными группами, включающими без ограничения направляющую группу, соединительную группу, модулятор фармакокинетики (ФК), полимер для доставки или носитель для доставки. Нуклеотидная группа может улучшать адресное взаимодействие, доставку или присоединение средства РНКи. Примеры направляющих групп и соединительных групп представлены в табл. 6.

Нуклеотидная группа может быть ковалентно связана с 3' и/или 5'-концом смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средство РНКи содержит нуклеотидную группу, связанную с 3' и/или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа связана с 5'-концом смысловой цепи альфа-ENaC средства РНКи. Нуклеотидная группа может быть соединена напрямую или непрямо со средством РНКи через линкерную/соединительную группу. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа соединена со средством РНКи через лабильную, расщепляемую или обратимую связь или линкер.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа улучшает фармакокинетические свойства или показатели биораспределения средства РНКи или конъюгата, к которому она присоединена для улучшения клеточноспецифического или тканеспецифического распределения и клеточноспецифического захвата конъюгата. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная группа увеличивает эндоцитоз средства РНКи.

Направляющие группы или направляющие молекулы улучшают фармакокинетические свойства или показатели биораспределения конъюгата или средства РНКи, к которому они присоединены для улучшения клеточноспецифического (в том числе, в некоторых случаях, органоспецифического) распределения и клеточноспецифического (или органоспецифического) захвата конъюгата или средства РНКи. Направляющая группа может быть моновалентной, двухвалентной, трехвалентной, тетравалентной или может иметь более высокую валентность в отношении мишени, против которой она направлена. Репрезентативные направляющие группы включают без ограничения соединения с аффинностью к молекуле клеточной поверхности, лигандам клеточных рецепторов, гаптену, антителам, моноклональным антителам, фрагментам антител и миметикам антител с аффинностью к молекулам клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа соединена со средством РНКи при помощи линкера, такого как ПЭГ-линкер или один, два или три абазических остатка и/или остатка рибита (абазических остатка рибозы), которые в некоторых случаях могут служить в качестве линкеров. В некоторых вариантах осуществления направляющая группа включает интегрин-направляющий лиганд.

Альфа-ENaC средства РНКи, описанные в настоящем документе, могут быть синтезированы с реакционноспособной группой, такой как аминокгруппа (также именуемая в настоящем документе как амин), на 5'-конце и/или 3'-конце. Реакционноспособная группа может затем использоваться для присоединения направляющей молекулы с помощью способов, стандартных в данной области.

Например, в некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, синтезируют с группой  $\text{NH}_2\text{-C}_6$  на 5'-конце смысловой цепи средства РНКи. Концевая аминокгруппа затем может быть подвергнута реакции с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  интегрин-направляющий лиганд. В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, синтезируют с одной или более алкиновыми группами на 5'-конце смысловой цепи средства РНКи. Концевая(ые) алкиновая(ые) группа(ы) может быть затем подвергнута реакции с образованием конъюгата, например, с группой, которая включает  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  интегрин-направляющий лиганд.

В некоторых вариантах осуществления направляющая группа включает интегрин-направляющий лиганд. В некоторых вариантах осуществления интегрин-направляющий лиганд представляет собой  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  интегрин-направляющий лиганд. Применение  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  интегрин-направляющего лиганда облегчает клеточноспецифическое адресное взаимодействие с клетками, имеющими  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  на своей соответствующей поверхности, при этом связывание интегрин-направляющего лиганда может способствовать проникновению терапевтического средства, такого как средство РНКи, с которым он связан, в клетки, такие как эпителиальные клетки, включая легочные эпителиальные клетки и почечные эпителиальные клетки. Интегрин-направляющие лиганды могут быть моновалентными или мновалентными (например, содержать один интегрин-направляющий фрагмент) или мультимерными или мультивалентными (например, содержать множество интегрин-направляющих фрагментов). Направляющая группа может быть присоединена к 3' и/или 5'-концу РНКи олигонуклеотида при использовании способов, известных в уровне техники. Получение направляющих групп, таких как  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  интегрин-направляющие лиганды, описано, например, в публикации Международной патентной заявки WO 2018/085415 и в предварительных заявках на патент США 62/580398 и 62/646739, содержание каждой из которых включено в настоящий документ во всей их полноте.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают фармацевтические композиции для доставки альфа-ENaC средства РНКи в легочную эпителиальную клетку *in vivo*. Такие фармацевтические композиции могут включать, например, альфа-ENaC средство РНКи, конъюгированное с направляющей группой, которая включает интегрин-направляющий лиганд. В некоторых вариантах осуществления интегрин-направляющий лиганд состоит из лиганда интегрина  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ .

В некоторых вариантах осуществления соединительная группа конъюгирована со средством РНКи. Соединительная группа облегчает ковалентное связывание средства с направляющей группой, модулятором фармакокинетики, полимером для доставки или носителем для доставки. Соединительная группа может быть соединена с 3' и/или 5'-концом смысловой цепи или антисмысловой цепи средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления соединительная группа связана со смысловой цепью средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления соединительная группа конъюгирована с 5' или 3'-концом смысловой цепи средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления соединительная группа конъюгирована с 5'-концом смысловой цепи средства РНКи. Примеры соединительных групп включают, без ограничения перечисленными, Alk-SMPT-C6, Alk-SS-C6, DBCO-TEG, Me-Alk-SS-C6 и C6-SS-Alk-Me, реакционноспособные группы, такие как первичные амины и алкины, алкильные группы, абазические остатки/нуклеотиды, аминокислоты, триалкин-функционализованные группы, рибит и/или ПЭГ-группы.

Линкерные или соединительные группы являются соединением между двумя атомами, которое связывает одну химическую группу (такую как средство РНКи) или представляющий интерес сегмент с другой химической группой (такой как направляющая группа, модулятор фармакокинетики или полимер для доставки) или представляющим интерес сегментом через одну или более ковалентных связей. Лабильное соединение содержит лабильную связь. Связь необязательно может включать спейсер, который увеличивает расстояние между двумя соединяемыми атомами. Спейсер может дополнительно увеличивать гибкость и/или длину связи. Спейсеры включают, без ограничения перечисленным, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, арильные группы, аралкильные группы, аралкенильные группы и аралкинильные группы, каждая из которых может содержать один или более гетероатомов, гетероциклов, аминокислот, нуклеотидов и сахаридов. Спейсерные группы известны в уровне техники, и предыдущий список не предназначен для ограничения объема описания.

В некоторых вариантах осуществления направляющие группы соединены с альфа-ENaC средствами РНКи без использования дополнительного линкера. В некоторых вариантах осуществления создана направляющая группа, имеющая линкер, облегчающий связывание с альфа-ENaC средством РНКи. В некоторых вариантах осуществления, когда два или больше средства РНКи включены в композицию, два или больше средства РНКи могут быть соединены с их соответствующими направляющими группами при использовании одинаковых линкеров. В некоторых вариантах осуществления, когда два или больше средства РНКи включены в композицию, два или больше средства РНКи соединяют с их соответствующими

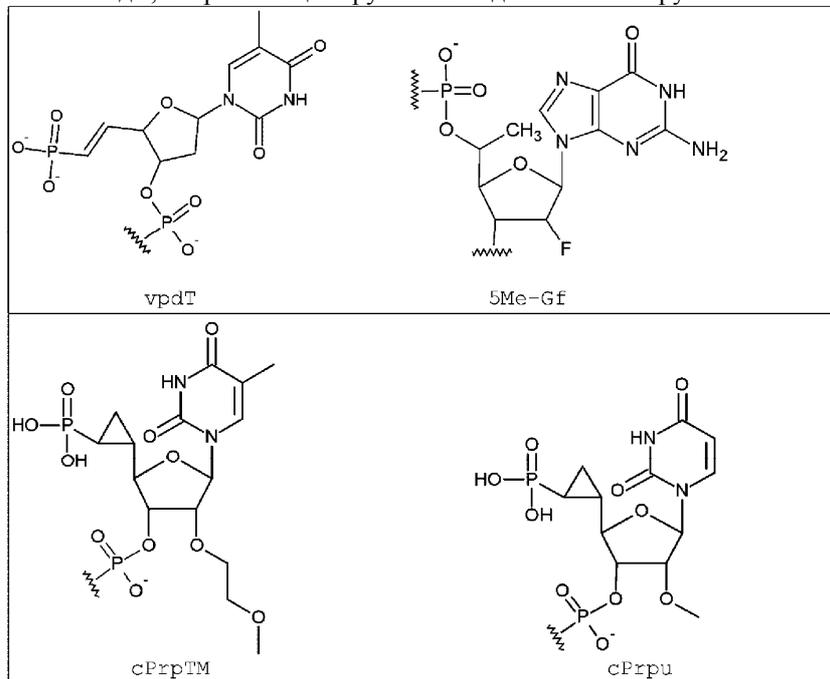
щими направляющими группами при использовании разных линкеров.

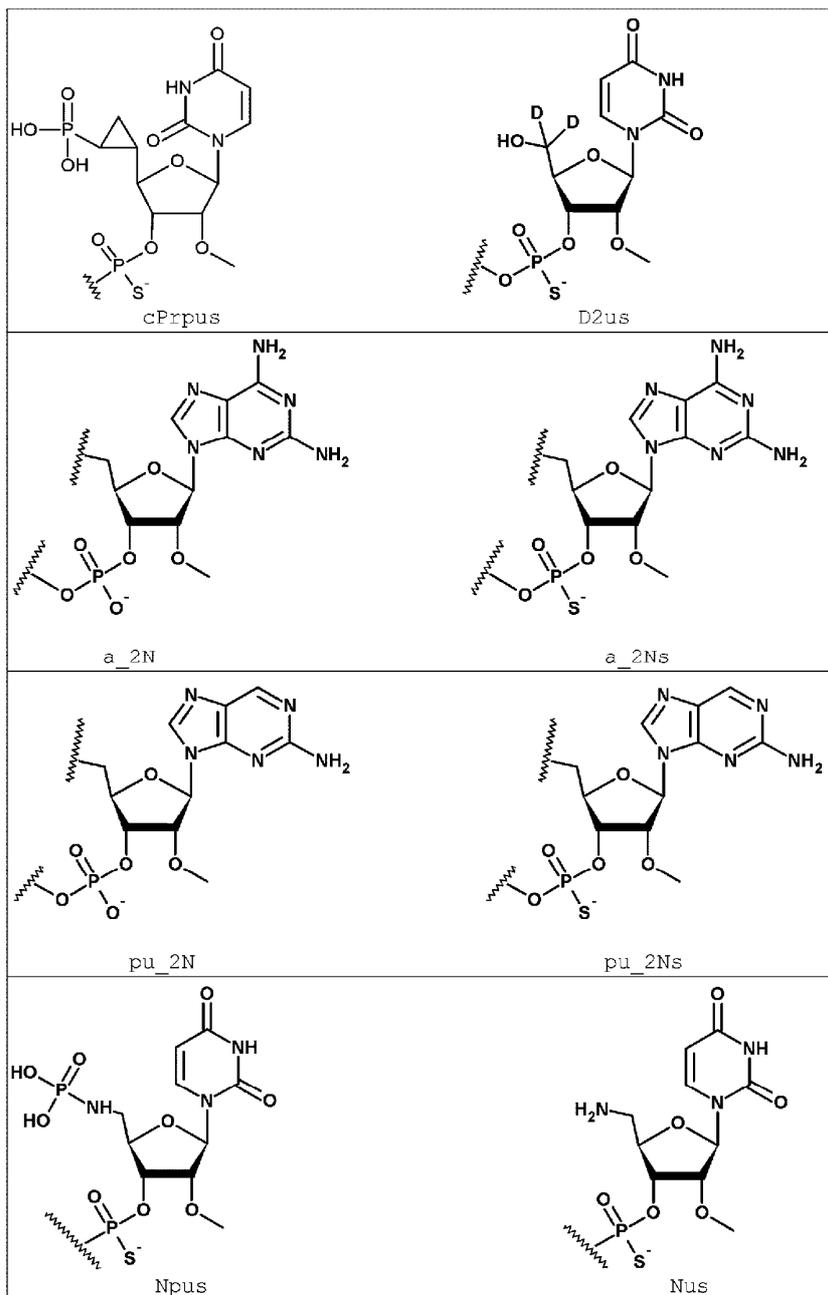
Любая из нуклеотидных последовательностей альфа-ENaC средства РНКи, перечисленных в табл. 2, 3 и 4, модифицированная или немодифицированная, может содержать 3' и/или 5'-направляющую(ие) группу(ы), соединительную(ые) группу(ы) и/или модулятор(ы) фармакокинетики. Любая из последовательностей альфа-ENaC средства РНКи, перечисленных в табл. 3 и 4 или описанных иным образом в настоящем документе, которые содержат 3' или 5'-направляющую группу, соединительную группу или модулятор фармакокинетики, могут в альтернативном варианте не содержать 3' или 5'-направляющую группу, соединительную группу или модулятор фармакокинетики или могут содержать другую 3' или 5'-направляющую группу, соединительную группу или модулятор фармакокинетики, включая без ограничения представленные в табл. 6. Любые из дуплексов альфа-ENaC средства РНКи, перечисленных в табл. 5, модифицированные или немодифицированные, могут дополнительно включать направляющую группу или соединительную группу, включая без ограничения представленные в табл. 6, при этом направляющая группа или соединительная группа может быть присоединена к 3' или 5'-концу смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса альфа-ENaC средства РНКи.

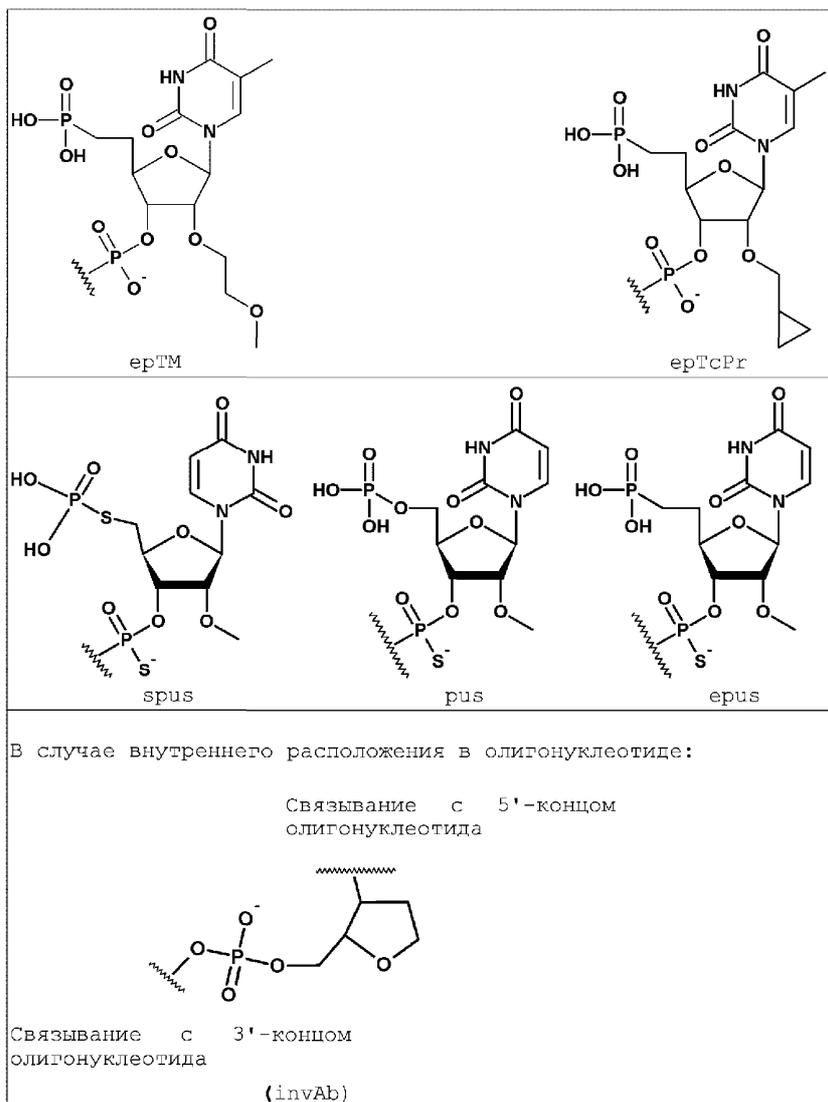
Примеры некоторых направляющих групп и соединительных групп представлены в табл. 6.

Таблица 6

Структуры, представляющие различные модифицированные нуклеотиды, направляющие группы и соединительные группы

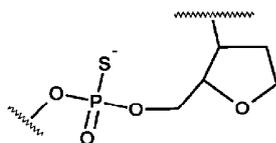






В случае внутреннего расположения в олигонуклеотиде:

Связывание с 5'-концом  
олигонуклеотида

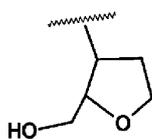


Связывание с 3'-концом  
олигонуклеотида

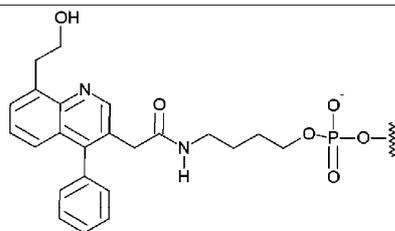
(invAb)s

В случае расположения на 3'-конце олигонуклеотида:

Связывание с 5'-концом  
олигонуклеотида

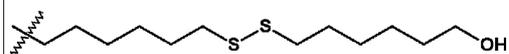


(invAb)

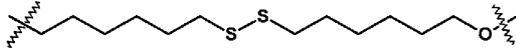
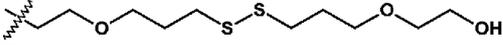
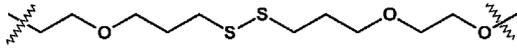
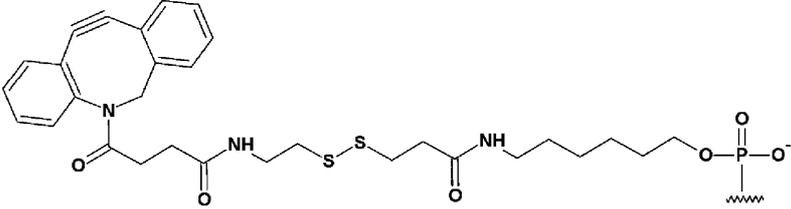
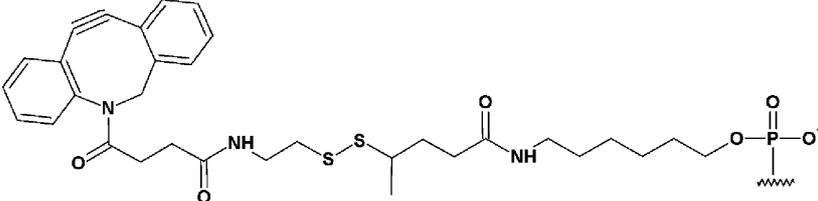
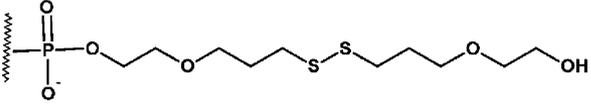


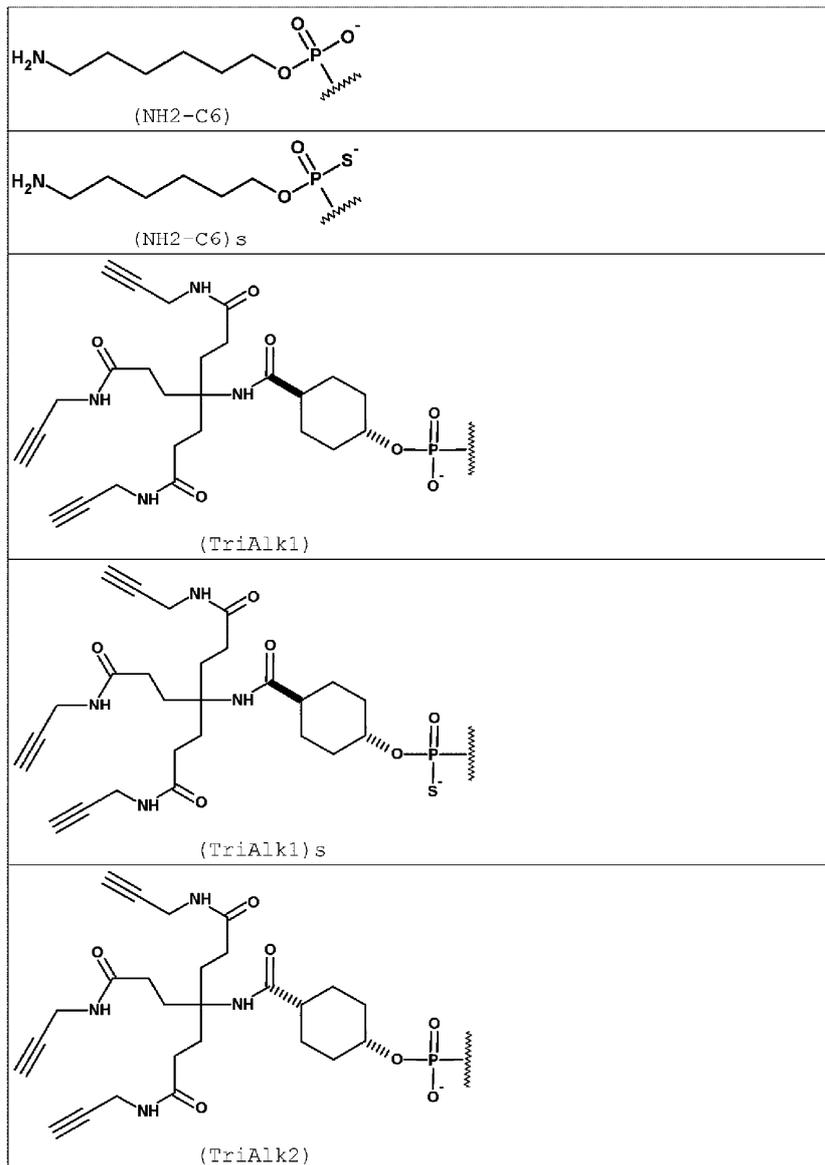
(PAZ)

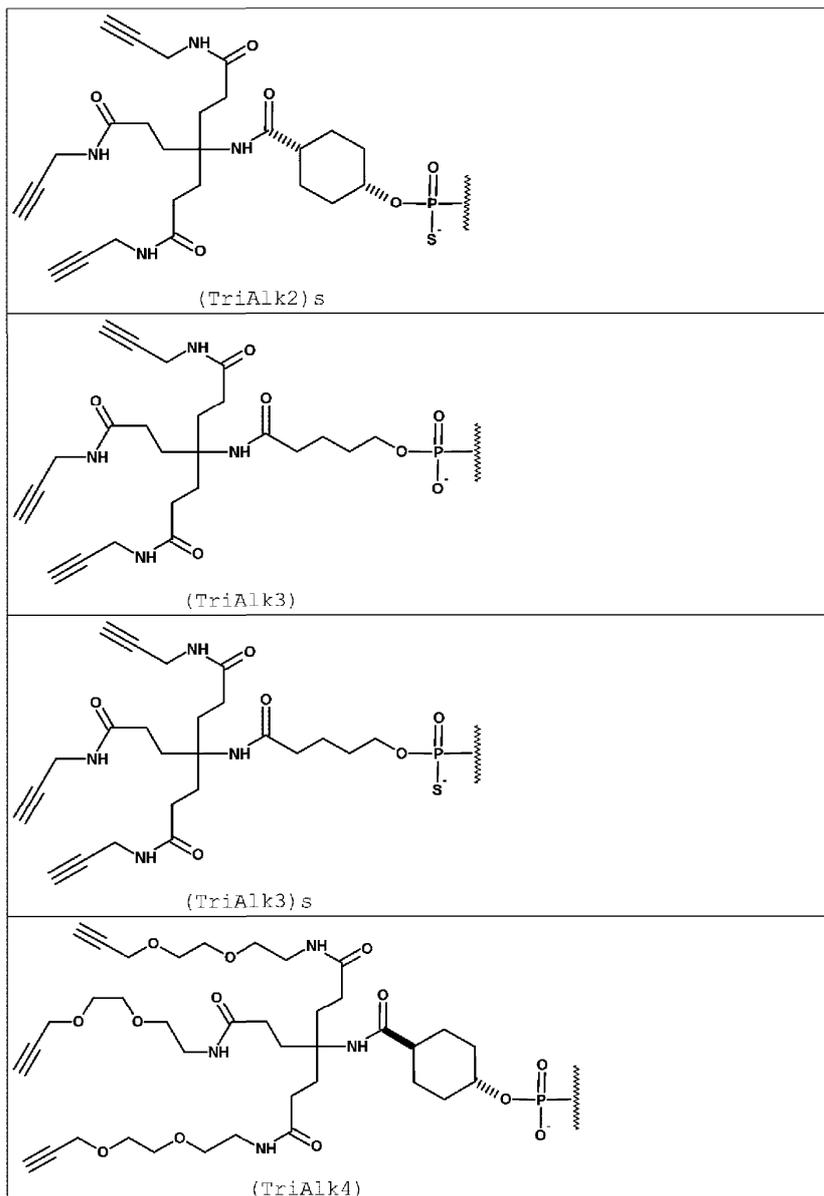
В случае расположения на 3'-конце олигонуклеотида:

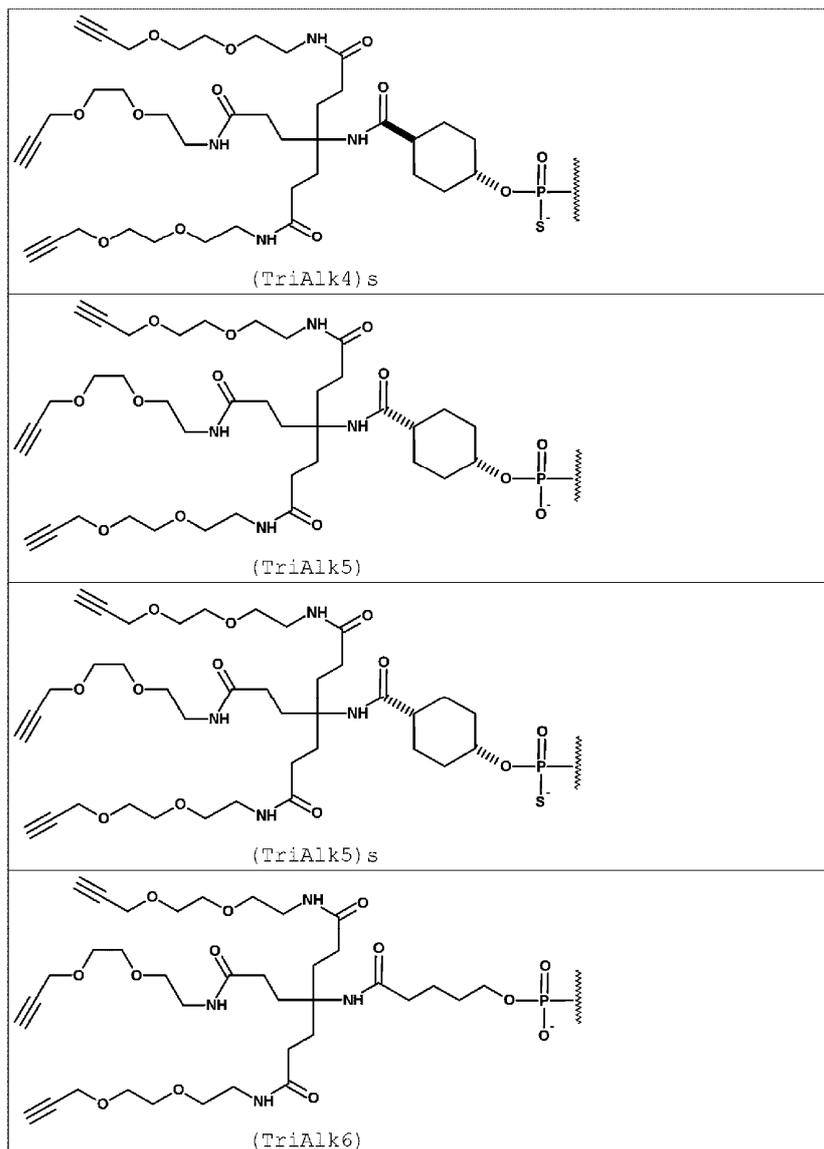


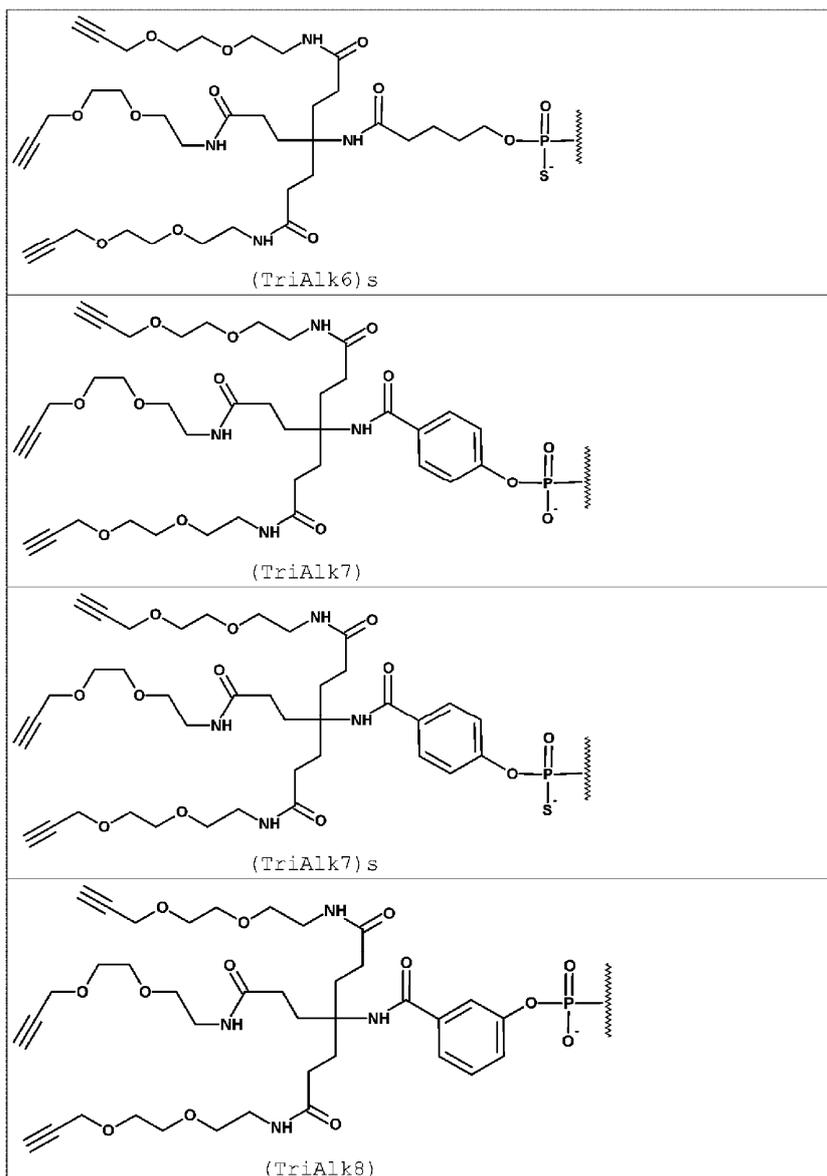
(C6-SS-C6)

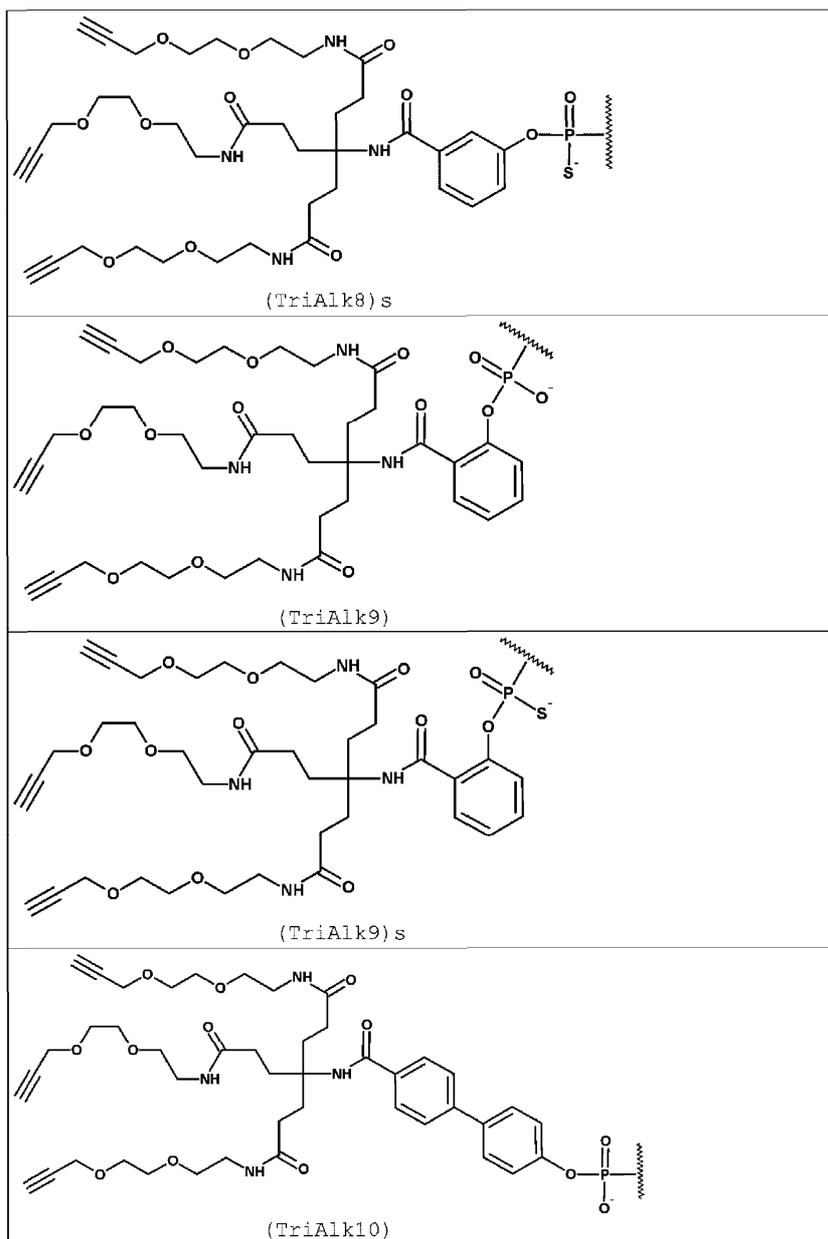
В случае внутреннего расположения в олигонуклеотиде:	
Связывание с 5'-концом олигонуклеотида	Связывание с 3'-концом олигонуклеотида
 (C6-SS-C6)	
В случае расположения на 3' конце олигонуклеотида:	
	
В случае внутреннего расположения в олигонуклеотиде:	
Связывание с 5'-концом олигонуклеотида	Связывание с 3'-концом олигонуклеотида
 (6-SS-6)	
 (C6-SS-Alk) или (Alk-SS-C6)	
 (C6-SS-Alk-Me)	
 (PEG-C3-SS)	

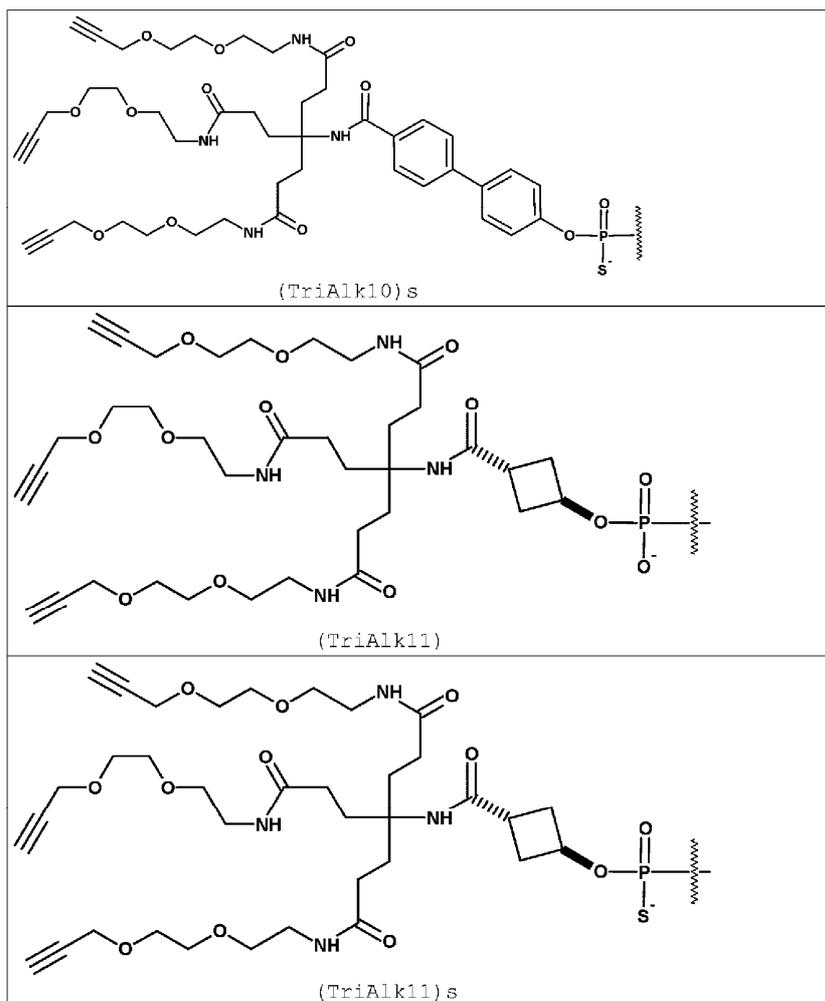


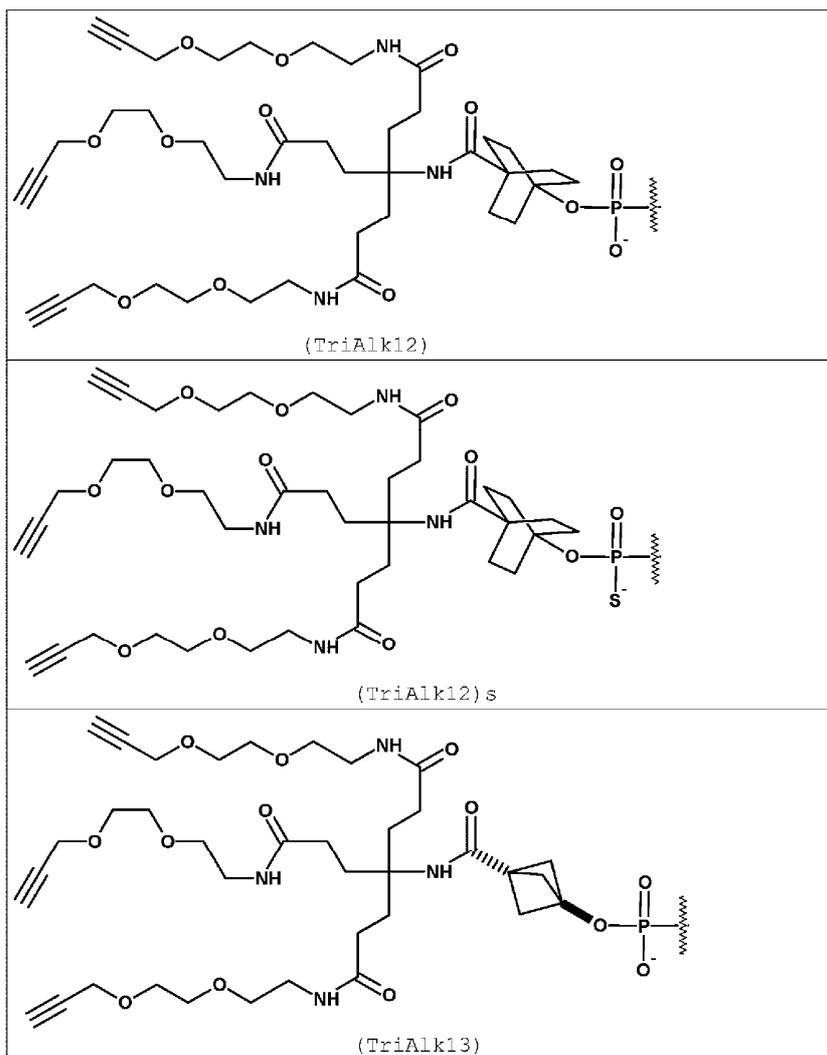


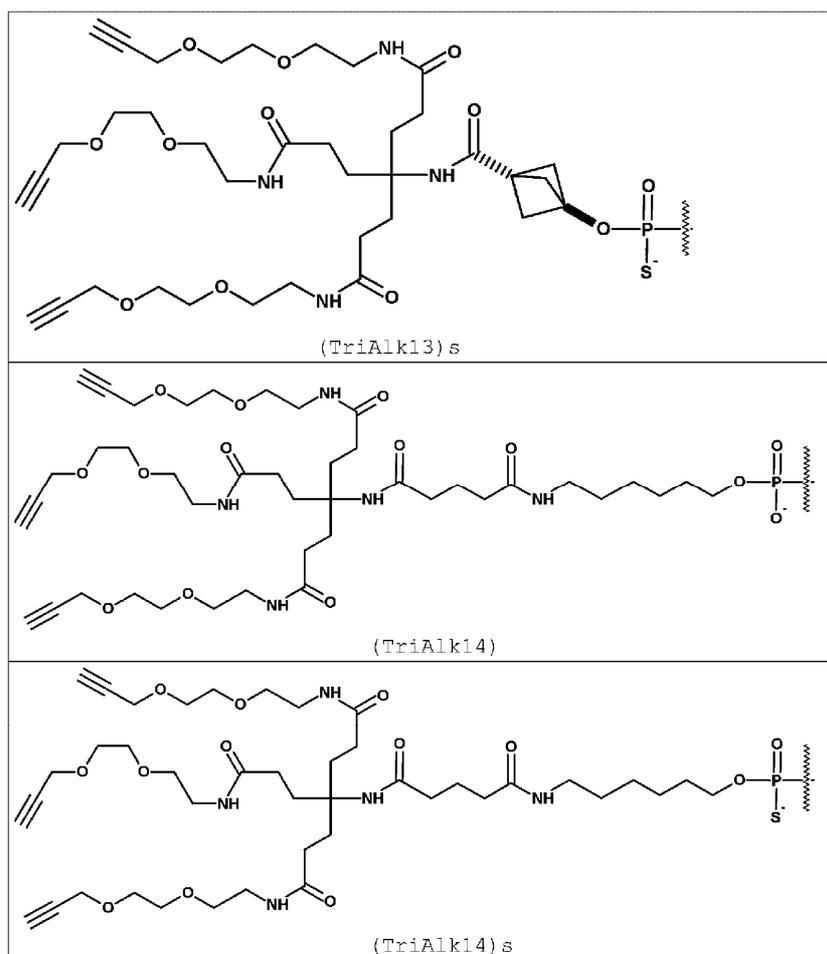












В альтернативе могут использоваться другие соединительные группы, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления носитель для доставки может использоваться для доставки средства РНКи в клетку или ткань. Носитель для доставки представляет собой соединение, которое улучшает доставку средства РНКи в клетку или ткань. Носитель для доставки может без ограничения следующим включать или состоять из полимера, такого как амфипатический полимер, мембраноактивный полимер, пептид, пептид мелиттин, мелиттиноподобный пептид (MLP), липид, обратимо модифицированный полимер или пептид или обратимо модифицированный мембраноактивный полиамин.

В некоторых вариантах осуществления средства РНКи могут комбинировать с липидами, наночастицами, полимерами, липосомами, мицеллами, DPC или другими системами доставки, доступными в уровне техники. Средства РНКи могут быть также химически конъюгированы с направляющими группами, липидами (включающими без ограничения холестерин и производные холестерина), наночастицы, полимеры, липосомы, мицеллы, DPC (см., например, WO 2000/053722, WO 2008/022309, WO 2011/104169 и WO 2012/083185, WO 2013/032829, WO 2013/158141, которые включены в настоящий документ посредством отсылки) или другие системы доставки, доступные в уровне техники.

Фармацевтические композиции и составы.

Альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, могут быть изготовлены в виде фармацевтических композиций или составов (также именуемых в настоящем документе как "лекарственные средства"). В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции включают по меньшей мере одно альфа-ENaC средство РНКи. Такие фармацевтические композиции, в частности, пригодны для ингибирования экспрессии мРНК альфа-ENaC в клетке-мишени, группе клеток, ткани или организме. Фармацевтические композиции могут применяться для лечения субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, при которых может быть эффективным снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. Фармацевтические композиции могут применяться для лечения субъекта, подвергающегося риску развития заболевания или нарушения, при которых может быть эффективным снижение уровня мРНК-мишени или ингибирование экспрессии гена-мишени. В одном варианте осуществления способ включает введение альфа-ENaC средства РНКи, связанного с направляющим лигандом, как описано в настоящем документе, субъекту, подлежащему лечению. В некоторых вариантах осуществления одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (включая растворители, носители, разбавители и/или полимеры для доставки) добавляют в фармацевтические композиции, которые включают альфа-ENaC средство РНКи, с получением в результате

фармацевтической композиции или лекарственного средства, подходящих для *in vivo* доставки субъекту, в том числе человеку.

Фармацевтические композиции, которые включают альфа-ENaC средство РНКи, и способы, раскрытые в настоящем документе, снижают уровень мРНК-мишени в клетке, группе клеток, ткани, органе или у субъекта, в том числе путем введения субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе альфа-ENaC средства РНКи, ингибируя таким образом экспрессию мРНК альфа-ENaC у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта было ранее идентифицировано или диагностировано наличие заболевания или нарушения, которое опосредовано, по меньшей мере частично, экспрессией ENaC. В некоторых вариантах осуществления у субъекта было ранее идентифицировано или диагностировано наличие повышенной активности ENaC в одной или более клетках или тканях. В некоторых вариантах у субъекта было ранее диагностировано одно или более респираторных заболеваний, таких как муковисцидоз, хронический бронхит, немукковисцидозный бронхоэктаз, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, инфекции дыхательных путей, первичная цилиарная дискинезия и карцинома легкого при муковисцидозе. В некоторых вариантах у субъекта ранее было диагностировано один или более глазных заболеваний, таких как синдром сухого глаза. В некоторых вариантах субъект страдает симптомами, связанными с одним или более респираторными заболеваниями, которые ассоциированы с или вызваны повышенной активностью ENaC.

В некоторых вариантах осуществления описанные фармацевтические композиции, содержащие альфа-ENaC средство РНКи, применяются для лечения или контроля клинических проявлений у субъекта, при которых может быть эффективным ингибирование экспрессии ENaC. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций вводят субъекту, нуждающемуся в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления введение любого из раскрытых альфа-ENaC средств РНКи можно применять для уменьшения количества, тяжести и/или частоты симптомов заболевания у субъекта.

Описанные фармацевтические композиции, которые включают альфа-ENaC средство РНКи, могут применяться для лечения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего заболевание или нарушение, при которых может быть эффективным снижение или ингибирование экспрессии мРНК альфа-ENaC. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят терапевтически эффективное количество одной или более фармацевтических композиций, которые включают альфа-ENaC средство РНКи, осуществляя таким образом лечение симптома. В других вариантах осуществления субъекту вводят профилактически эффективное количество одного или более альфа-ENaC средств РНКи, предотвращая или ингибируя таким образом по меньшей мере один симптом.

Путь введения является путем, которым альфа-ENaC средство РНКи приводят в контакт с телом. В целом способы введения лекарственных средств, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот для лечения млекопитающего известны в уровне техники и могут быть применены для введения композиций, описанных в настоящем документе. Альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, могут вводить любым подходящим путем в препарате, соответствующим образом изготовленном для конкретного пути. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе фармацевтические композиции вводят путем ингаляции, интраназального введения, эндотрахеального введения или орофарингеального аспирационного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции могут вводить путем инъекции, например внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрисуставно или внутривентриально, или наружно.

Фармацевтические композиции, включающие альфа-ENaC средство РНКи, описанное в настоящем документе, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, ткань или организм субъекта с помощью технологий доставки олигонуклеотида, известных в уровне техники. В целом любой подходящий способ, известный в уровне техники для доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*), может быть адаптирован для применения с композициями, описанными в настоящем документе. Например, доставка может осуществляться путем местного введения (например, прямого введения, имплантации или наружного применения), системного введения или подкожным, внутривенным, внутривентриальным или парентеральным путем, включая внутривентриальное (например, интравентрикулярное, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, чрескожное, в дыхательные пути (аэрозольное), назальное, пероральное, ректальное или наружное (в том числе буккальное и подъязычное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят посредством ингаляции, интраназального введения, орофарингеального аспирационного введения или внутритрахеального введения. Например, в некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы альфа-ENaC средства РНКи, описанные в настоящем документе, ингибировали экспрессию гена альфа-ENaC в эпителии легких, для чего наиболее подходящим и предпочтительным является введение путем ингаляции (например, с помощью ингаляторного устройства, такого как дозирующий ингалятор, или небулайзера, такого как струйный небулайзер, или небулайзер с вибрирующей сеткой, или ингалятор Soft Mist).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включают один или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, изготовлены в составах для введения субъекту.

При использовании в настоящем документе фармацевтическая композиция или лекарственное средство включают фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного из описанных терапевтических соединений и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (вспомогательные вещества) являются веществами, отличными от активного фармацевтического ингредиента (АФИ, терапевтического продукта, например альфа-ЕNaС средства РНКи), которые специально включены в систему доставки лекарственных средств. Вспомогательные вещества не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического действия в предусмотренной дозе. Вспомогательные вещества могут применяться

- а) вспомогательно для технологической обработки системы доставки лекарственного средства в процессе производства,
- б) для защиты, поддержания или повышения стабильности, биодоступности или приемлемости АФИ для пациента,
- с) для помощи при идентификации продукта, и/или
- д) улучшения любого другого показателя общей безопасности, эффективности доставки АФИ во время хранения или применения.

Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может быть или может не быть инертным веществом.

Вспомогательные вещества включают, без ограничения перечисленными, усилители абсорбции, антиагезивы, пеногасители, антиоксиданты, связующие вещества, буферные вещества, носители, вещества для получения покрытия, красители, улучшающие доставку вещества, полимеры для доставки, детергенты, декстран, декстозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, объемообразователи, наполнители, ароматизаторы, скользящие вещества, увлажняющие вещества, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, поверхностно-активные вещества, суспендирующие вещества, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, регуляторы тоничности, растворители, гидрофобные вещества и смачивающие вещества.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор хлорида натрия, бактериостатическую воду, Cremophor® ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения и должен быть защищен от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, при помощи покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и при использовании поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией компонентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией на фильтре. Как правило, дисперсии приготавливаются путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые компоненты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способы приготовления включают вакуумную сушку и лиофильную сушку, которые дают порошок действующего вещества плюс любой дополнительный требуемый компонент из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Композиции, подходящие для внутрисуставного введения, могут находиться в форме стерильного водного препарата лекарственного средства, которое может быть в микрокристаллической форме, например в форме водной микрокристаллической суспензии. Липосомные композиции или биоразлагаемые полимерные системы также могут использоваться для получения лекарственного средства как для внутрисуставного, так и для офтальмологического введения.

Композиции, подходящие для ингаляционного введения, могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, композиции для ингаляционного введения представляют собой стерильные растворы с физиологическим рН и имеют низкую вязкость (<5 сП). Соли могут быть добавлены в композицию для уравнивания тоничности. В некоторых случаях могут быть добавлены поверхностно-активные вещества или сорастворители для повышения растворимости активного соединения и улучшения свойств аэрозоля. В некоторых случаях вспомогательные вещества могут добавлять для регу-

лирования вязкости, чтобы обеспечить требуемый размер и распределение капель аэрозоля.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут предохранять соединение от быстрого выведения из организма, например, в форме композиции с регулируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций будут очевидны специалистам в данной области. Липосомные суспензии также могут использоваться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены согласно способам, известным специалистам в данной области, например, как описано в патенте США 4522811.

Альфа-ENaC средства РНКи могут быть изготовлены в виде композиций в стандартной лекарственной форме для удобства введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве стандартных доз для субъекта, подлежащего лечению. Каждая единица содержит заданное количество активного соединения, вычисленное для оказания требуемого терапевтического действия, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификации для стандартных лекарственных форм настоящего изобретения определяются и непосредственно зависят от уникальных свойств активного соединения и от терапевтического действия, которое нужно получить, и от ограничений, стандартных в области производства композиций такого активного соединения для лечения пациентов.

Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, без ограничения перечисленными, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства (например, антигистаминное средство, дифенгидрамин и т.д.). Также предполагается, что клетки, ткани или изолированные органы, которые экспрессируют или включают определенные в настоящем документе средства РНКи, могут применяться в качестве "фармацевтических композиций". При использовании в настоящем документе "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к такому количеству средства РНКи, которое обеспечивает получение фармакологического, терапевтического или профилактического результата.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, дополнительно включают этап применения второго лекарственного средства или лечения в дополнение к введению средства РНКи, раскрытого в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вторым лекарственным средством является другое альфа-ENaC средство РНКи (например, альфа-ENaC средство РНКи, которое направленно взаимодействует с другой последовательностью в альфа-ENaC-мишени). В других вариантах осуществления второе лекарственное средство может быть низкомолекулярным лекарственным средством, антителом, фрагментом антитела и/или аптамером.

Как правило, эффективное количество альфа-ENaC средства РНКи, раскрытого в настоящем документе, будет находиться в пределах от приблизительно 0,0001 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела/день, например от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг массы тела/день. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество альфа-ENaC средства РНКи будет находиться в пределах от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,500 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество альфа-ENaC средства РНКи будет находиться в пределах от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество альфа-ENaC средства РНКи будет находиться в пределах от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,050 мг/кг массы тела на дозу. Вводимое количество также будет с определенной вероятностью зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность вводимого соединения, композиция лекарственного средства, присутствие и типы вспомогательных веществ в композиции и пути введения. Кроме того, следует понимать, что начальная вводимая доза может быть увеличена с превышением указанной выше верхней границы для быстрого достижения требуемого уровня в крови или в ткани или начальная доза может быть меньше, чем оптимальное количество.

Для лечения заболевания или для получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания, фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включающие альфа-ENaC средство РНКи, можно комбинировать со вспомогательным веществом или со вторым лекарственным средством или лечением, включающими без ограничения второе или другое средство РНКи, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела, пептид и/или аптамер.

Описанное альфа-ENaC средство РНКи при добавлении к фармацевтически приемлемым вспомогательным веществам или адьювантам, может быть упаковано в наборы, контейнеры, упаковки или дозаторы. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть упакованы в ингаляторах сухого порошка или аэрозольных ингаляторах, других дозирующих ингаляторах, небулайзерах, предварительно заполненных шприцах или флаконах.

Способы лечения и ингибирование экспрессии.

Альфа-ENaC средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для лечения

субъекта (например, человека или другого млекопитающего), имеющего заболевание или нарушение, при котором может быть эффективным введение средства РНКи. В некоторых вариантах осуществления средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для лечения субъекта (например, человека), для которого может быть благоприятным снижение и/или ингибирование экспрессии мРНК альфа-ENaC.

В некоторых вариантах осуществления средства РНКи, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для лечения субъекта (например, человека), у которого может быть эффективным снижение активности канала ENaC, имеющего заболевание или нарушение, включающее без ограничения, например, муковисцидоз, хронический бронхит, немукковисцидозный бронхоэктаз, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ), астму, инфекции дыхательных путей, первичную цилиарную дискинезию и/или карциному легкого при муковисцидозе и/или синдром сухого глаза. Лечение субъекта может включать терапевтическое и/или профилактическое лечение. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество одного или более альфа-ENaC средств РНКи, описанных в настоящем документе. Субъект может быть человеком, пациентом или пациентом-человеком. Субъект может быть взрослым, подростком, ребенком или грудным ребенком. Введение фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, могут производить человеку или животному.

Повышенная активность ENaC, как известно, способствует дегидратации секрета на поверхности дыхательных путей и нарушению мукоцилиарного клиренса. В некоторых вариантах осуществления описанные альфа-ENaC средства РНКи применяются для лечения по меньшей мере одного симптома, опосредованного, по меньшей мере частично, уровнями активности ENaC, у субъекта. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество любого одного или более из описанных альфа-ENaC средств РНКи. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят профилактически эффективное количество любого одного или более из описанных средств РНКи, осуществляя, таким образом, лечение субъекта путем предотвращения или ингибирования по меньшей мере одного симптома.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения заболеваний, нарушений, состояний или патологических состояний, опосредованных, по меньшей мере частично, экспрессией гена альфа-ENaC, у нуждающегося в этом пациента, где способы включают введение пациенту любого из альфа-ENaC средств РНКи, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления альфа-ENaC средства РНКи применяются для лечения или контроля клинического проявления или патологического состояния у субъекта, где клиническое проявление или патологическое состояние опосредовано, по меньшей мере частично, экспрессией ENaC. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество одного или более альфа-ENaC средств РНКи или композиций, содержащих альфа-ENaC средство РНКи, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, включающей альфа-ENaC средство РНКи, описанное в настоящем документе, субъекту, подлежащему лечению.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или уровень мРНК гена альфа-ENaC в некоторых эпителиальных клетках субъекта, которому вводят описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижается по меньшей мере на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше чем 99% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи. В некоторых вариантах осуществления уровни ENaC или уровни активности канала ENaC в некоторых эпителиальных клетках субъекта, которому вводят описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижаются по меньшей мере на приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше чем 99% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи. Уровень экспрессии гена, содержание белка и/или уровень мРНК у субъекта могут быть понижены в клетке, группе клеток и/или ткани субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровни мРНК альфа-ENaC в некоторых эпителиальных клетках субъекта, которому было введено описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижается по меньшей мере на приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи. В некоторых вариантах осуществления уровень гетеротримерный белковый комплекс ENaC в некоторых эпителиальных клетках у субъекта, которому было введено описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижается по меньшей мере на приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи. Уровень ENaC у субъекта может быть понижен в клетке, группе клеток, ткани, крови и/или другой жидкости субъекта. Например, в некоторых вариантах осуществления уровень мРНК альфа-ENaC и/или гетеротримерного белкового комплекса ENaC в легочных эпителиальных клетках субъекта, которому было введено описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижается по меньшей мере на приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК альфа-ENaC и/или гетеротримерного белкового комплекса ENaC и/или уровни активности канала ENaC в субпопуляции легочных эпителиальных кле-

ток, таких как эпителиальные клетки дыхательных путей, субъекта, которому было введено описанное альфа-ENaC средство РНКи, снижается по меньшей мере на приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% по сравнению с субъектом до введения альфа-ENaC средства РНКи или с субъектом, не получающим альфа-ENaC средство РНКи.

Снижение экспрессии гена, мРНК и уровня белка можно оценить с помощью любых способов, известных в уровне техники. Снижение или уменьшение уровня мРНК альфа-ENaC, уровня активности канала ENaC и/или уровней гетеротримерного белкового комплекса ENaC совокупно именуется в настоящем документе как снижение или уменьшение альфа-ENaC, или ингибирование, или снижение экспрессии гена альфа-ENaC. Примеры, представленные в настоящем документе, иллюстрируют известные способы оценки ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC.

Клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы.

Предусмотрены клетки, ткани, органы и не относящиеся к человеку организмы, которые включают по меньшей мере одно из альфа-ENaC средств РНКи, описанных в настоящем документе. Клетка, ткань, орган или не относящийся к человеку организм получены путем доставки средства РНКи в клетку, ткань, орган или не относящийся к человеку организм.

Представленные выше варианты осуществления и объекты проиллюстрированы далее следующими неограничивающими примерами.

### Примеры

Пример 1. Синтез альфа-ENaC средств РНКи.

Дуплексы альфа-ENaC средств РНКи, показанные в табл. 5, синтезировали в соответствии со следующим.

А. Синтез.

Смысловые и антисмысловые цепи альфа-ENaC средств РНКи синтезировали согласно фосфорамидитной технологии на твердой фазе, используемой в синтезе олигонуклеотидов. В зависимости от масштаба использовали MerMade96E® (Bioautomation), MerMadel2® (Bioautomation) или OP Pilot 100 (GE Healthcare). Синтезы проводили на твердой подложке, изготовленной из пористого стекла с порами заданного размера (CPG, 500A или 600A, полученного от Prime Synthesis, Aston, PA, USA). Все РНК и 2'-модифицированные РНК фосфорамидиты приобретали в Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA). В частности, 2'-О-метил фосфорамидиты, которые использовали, включали следующее: (5'-О-диметокситритил-N6-(бензоил)-2'-О-метиладенозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)-фосфорамидит, 5'-О-диметокси-тритил-N4-(ацетил)-2'-О-метил-цитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил-амино)фосфорамидит, (5'-О-диметокситритил-N<sup>2</sup>-(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит и 5'-О-метил-диметокситритил-2'-О-уридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит. 2'-Дезокси-2'-фтор-фосфорамидиты несли такие же защитные группы, как 2'-О-метил РНК амидиты. 5'-диметокситритил-2'-О-метилюридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидиты приобретали в Glen Research (Virginia). Инвертированные абазические (3'-О-диметокситритил-2'-дезоксирибоза-5'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)-фосфорамидиты приобретали в ChemGenes (Wilmington, MA, USA). Использовали следующие UNA фосфорамидиты: 5'-(4,4'-диметокситритил)-N6-(бензоил)-2',3'-секо-аденозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-ацетил-2',3'-секо-цитозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит, 5'-(4,4'-диметокситритил)-N-изобутирил-2',3'-секо-гуанозин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит и 5'-(4,4'-диметокситритил)-2',3'-секо-уридин, 2'-бензоил-3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидит. ТФА-амиолинкерные фосфорамидиты также приобретали на коммерческой основе (ThermoFisher).

Триалкинсодержащие фосфорамидиты растворяли в безводном дихлорметане или безводном ацетонитриле (50 мм), тогда как все остальные амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (50 мм) и добавляли молекулярные сита (3Å). 5-Бензилтио-1Н-тетразол (БТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле) использовали в качестве активирующего раствора. Время присоединения составляло 10 мин (РНК), 90 с (2' О-Ме) и 60 с (2' F). Для введения фосфотиоатных связей использовали 100 мМ раствор 3-фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, полученного от PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USA) в безводном ацетонитриле.

В альтернативе триалкиновые группы вводили после синтеза (см. раздел E ниже). Для этого способ смысловую цепь функционализировали 5' и/или 3'-концевыми нуклеотидами, содержащими первичный амин. ТФА-амиолинкерный фосфорамидит растворяли в безводном ацетонитриле (50 мМ) и добавляли молекулярные сита (3Å). 5-Бензилтио-1Н-тетразол (БТТ, 250 мМ в ацетонитриле) или 5-этилтио-1Н-тетразол (ЕТТ, 250 мМ в ацетонитриле) использовали в качестве активирующего раствора. Время присоединения составляло 10 мин (РНК), 90 с (2' О-Ме) и 60 с (2' F). Для введения фосфотиоатных связей использовали 100 мМ раствор 3-фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она (POS, полученного в PolyOrg, Inc., Leominster, MA, USA) в безводном ацетонитриле.

В. Отщепление и удаление защитной группы связанного с подложкой олигомера.

После завершения твердофазного синтеза высушенную твердую подложку обрабатывали раствором 1:1 по объему 40 вес.% метиламина в воде и 28-31% раствором гидроксида аммония (Aldrich) в течение

1,5 ч при 30°C. Раствор выпаривали и восстанавливали твердый остаток в воде (см. ниже).

#### С. Очистка.

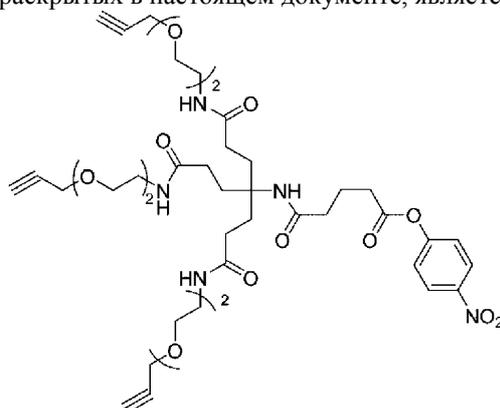
Неочищенные олигомеры очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ при использовании колонки TSKgel SuperQ-5PW 13 мкм и системы Shimadzu LC-8. Буфер А содержал 20 мМ Трис, 5 мМ ЭДТА, pH 9,0 и 20% ацетонитрила, и буфер В имел такой же состав, как буфер А, но с добавкой 1,5 М хлорида натрия. УФ-сигналы регистрировали при 260 нм. Целевые фракции объединяли в пулы, затем вводили в эксклюзионную ВЭЖХ с использованием колонки GE Healthcare XK 16/40, набитой Sephadex G-25 fine с рабочим буфером, содержащим 100 мМ бикарбоната аммония, pH 6,7, и 20% ацетонитрила или фильтрованную воду. В альтернативе смешанные фракции обессоливали и меняли буфер или систему растворителей с помощью фильтрации в тангенциальном потоке.

#### Д. Отжиг.

Комплементарные цепи смешивали, объединяя эквимоллярные растворы РНК (смысловых и антисмысловых) в 1× PBS (фосфатно-солевом буфере, 1×, Corning, Cellgro) с получением средств РНКи. Некоторые средства РНКи лиофилизировали и хранили при температуре от -15 до -25°C. Концентрацию дуплексов определяли при измерении оптической плотности раствора на УФ-вид спектрометре в 1× PBS. Затем оптическую плотность раствора при 260 нм умножали на коэффициент перевода и коэффициент разведения для определения концентрации дуплекса. Если не указано иное, использовали коэффициент перевода 0,037 мг/(мл·см).

#### Е. Конъюгирование триалкинового линкера.

До или после отжига, 5' или 3'-аминофункционализированную смысловую цепь конъюгировали с триалкиновым линкером. Примерная структура триалкинового линкера, которая может использоваться при получении конструкций, раскрытых в настоящем документе, является следующей:



Далее описано конъюгирование триалкинового линкера с отожженным дуплексом. Аминофункционализированный дуплекс растворяли в 90% ДМСО/10% H<sub>2</sub>O при ~50-70 мг/мл. Добавляли 40 эквивалентов триэтиламина, затем 3 эквивалента триалкин-РНК. После завершения реакции конъюгат два раза осаждали в системе растворителей 1× фосфатно-солевой буфер/ацетонитрил (отношение 1:14) и сушили.

#### Ф. Конъюгирование направляющих лигандов.

До или после отжига 5' или 3' тридентатную алкинфункционализированную смысловую цепь конъюгировали с направляющими лигандами. В следующем примере описано конъюгирование направляющих лигандов с отожженным дуплексом. Стоковые растворы 0,5 М трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТНРТА), 0,5 М пентагидрата сульфата Cu(II) (Cu(II)SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) и 2 М раствор аскорбата натрия приготавливали в деионизированной воде. Приготавливали 75 мг/мл раствор направляющего лиганда в ДМСО. В 1,5 мл центрифужные пробирки, содержащие триалкинфункционализированный дуплекс (3 мг, 75 мкл, 40 мг/мл в деионизированной воде, ~15000 г/моль), добавляли 25 мкл 1 М буфера HEPES, pH 8,5. После перемешивания на вортексе добавляли 35 мкл ДМСО и перемешивали раствор на вортексе. Направляющий лиганд добавляли к реакционной смеси (6 эквивалентов/дуплекс, 2 эквивалента/алкин, ~15 мкл) и перемешивали раствор на вортексе. С помощью индикаторных полосок проверяли pH и подтверждали значение pH ~8. В отдельной 1,5 мл центрифужной пробирке 50 мкл 0,5 М ТНРТА смешивали с 10 мкл 0,5 М Cu(II)SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Через 5 мин раствор ТНРТА/Cu (7,2 мкл, 6 эквивалентов 5:1 ТНРТА:Cu) добавляли в реакционный сосуд и перемешивали на вортексе. Сразу после этого в реакционный сосуд добавляли 2 М аскорбат (5 мкл, 50 эквивалентов на дуплекс, 16,7 на алкин) и перемешивали на вортексе. После завершения реакции (обычно за 0,5-1 ч) реакционную смесь сразу очищали с помощью неденатурирующей анионообменной хроматографии.

#### Пример 2. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи мышам.

Для оценки активности альфа-ENaC средств РНКи *in vivo*, самцам мышей ICR с помощью микро-распылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA), подходящего для эндотрахеального (ЭТ) введения, в дни исследования 1 и 2 вводили 50 мкл изотонического солевого раствора для использования

в качестве контроля или 5 мг/кг одного из следующих альфа-ENaC средств РНКи без конъюгированного лиганда (т.е. "голое средство РНКи"), приготовленных в изотоническом солевом растворе: AD04019, AD04020, AD04021, AD04022, AD04023, AD04024, AD04025 или AD04026 (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере).

В каждой группе вводили дозы 4 или 5 мышам. Мышей умерщвляли (sac) в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

На фиг. 1 показана относительная экспрессия композиций идентифицированных альфа-ENaC средств РНКи (AD04019, AD04020, AD04021, AD04022, AD04023, AD04024, AD04025 и AD04026), при этом каждое средство РНКи продемонстрировало значимое снижение экспрессии альфа-ENaC в легких по сравнению с контролем растворителем.

Пример 3. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи мышам.

В дни исследования 1 и 2 самцам мышей ICR с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA), подходящего для эндотрахеального (ЭТ) введения, вводили 50 мкл изотонического солевого раствора для использования в качестве контроля или 3 мг/кг альфа-ENaC средства РНКи (т.е. или AD04025 или AD04858 (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере)), приготовленного в изотоническом солевом растворе. В каждой группе вводили дозу 4 или 5 мышам. Мышей умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

На фиг. 2 показана относительная экспрессия альфа-ENaC средств РНКи AD04025 и AD04858, где оба средства РНКи продемонстрировали значимое снижение экспрессии альфа-ENaC в легких по сравнению с контролем.

Пример 4. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи с и без конъюгирования с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В дни исследования 1 и 2 самцам крыс линии Спрэг-Дуули с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA), подходящего для эндотрахеального (ЭТ) введения, вводили 200 мкл 0,5, 1,5 или 5 мг/кг альфа-ENaC средства РНКи, приготовленного в изотоническом солевом растворе. В каждой группе дозу вводили пяти (5) крысам. Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

На фиг. 3 показана относительная экспрессия альфа-ENaC средств РНКи AD04025 и AD04025-конъюгата. AD04025-конъюгат синтезировали после синтеза, связывая интегрин-направляющий лиганд на пептидной основе, обладающий аффинностью к интегрину  $\alpha v \beta 6$ , через маскированный поли-L-лизиновый (PLL) каркас, с аминогруппой, которую добавляли на 5'-конец смысловой цепи средства РНКи (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере). Хотя и голое средство РНКи, и конъюгат средства РНКи показали существенное снижение экспрессии альфа-ENaC в легких по сравнению с исходными измерениями, AD04025-конъюгат показал улучшенный в числовом выражении уровень нокдауна при каждом из трех измеренных уровней дозы (0,5, 1,5 и 5 мг/кг), причем наиболее заметное улучшение наблюдали при дозе 1,5 мг/кг (78% нокдаун с лигандом и 47% нокдаун без лиганда).

Пример 5. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ENaC средства РНКи, конъюгированного с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс Спрэг-Дуули путем орофарингеального (ОФ) аспирационного введения с помощью пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 7.

Таблица 7

## Группы введения доз крысам в примере 5

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05454, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05455, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05456, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05457, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM2 в группах 2-7, имеет структуру, представленную на фиг. 4, который был конъюгирован со средством РНКи через концевой амин (т.е. путем образования ковалентной связи с концевой группой  $\text{NH}_2\text{-C}_6$ ) на 5'-конце смысловой цепи.

В каждой группе вводили дозу пяти (5) крысам ( $n=5$ ). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое,  $\pm 95\%$  доверительный интервал).

Таблица 8

## Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 5

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC ( $n=5$ для каждой группы)	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,161	0,192
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347)	0,411	0,039	0,042
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05453)	0,678	0,092	0,106
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05454)	0,728	0,127	0,154
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05455)	0,663	0,075	0,084
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05456)	0,633	0,101	0,120
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05457)	0,726	0,174	0,228

Как показано в табл. 8 выше, каждое альфа-ENaC средство РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем. Например, AD05347, которое включает циклопропилфосфонатную группу, расположенную на 5'-конце антисмысловой цепи, показало среднее снижение приблизительно на 59% (0,411) мРНК по сравнению с контрольной группой. Кроме того, остальные альфа-ENaC средства РНКи показали снижение мРНК гENaC по меньшей мере приблизительно на 27% по сравнению с контролем.

Пример 6. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуули с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA), подходящего для эндотрахеального (ЭТ) введения, вводили 200 мкл изотонического солевого раствора для использования в качестве контроля или одного из следующих альфа-ENaC средств РНКи согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 9.

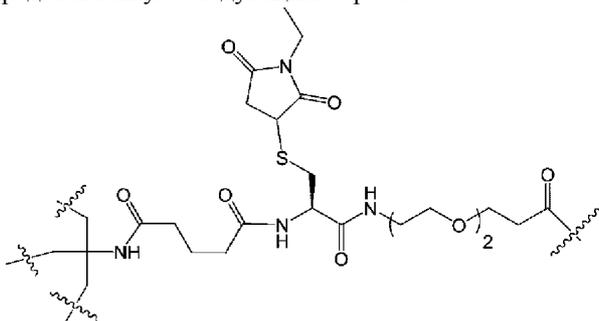
Таблица 9

## Группы введения доз крысам в примере 6

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ЭТ доза в день 1
2	1,5 мг/кг AD04835, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1
3	1,5 мг/кг AD04835, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM1), дополнительно включающего связь цистеин-ПЭГ <sub>2</sub> , на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1
4	1,5 мг/кг AD05346, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1
5	1,5 мг/кг AD05345, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1
6	1,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1
7	1,5 мг/кг AD04835, конъюгированного с монодентатным лигандом на пептидной основе, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), который дополнительно включал ПЭГ <sub>20</sub> -линкер, после которого следовал пептидный линкер (PheCitPhePro (SEQ ID NO: 290)), ПЭГ-группа массой 20 килодальтон (кДа), цистеиновый линкер, который затем был конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ЭТ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta 6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM1 в группах 2, 5 и 6, имеет структуру, представленную на фиг. 5, который конъюгирован со средством РНКи через концевой амин (т.е. путем образования ковалентной связи с концевой группой NH<sub>2</sub>-С6) на 5'-конце смысловой цепи. Для групп 3 и 4 тридентатный низкомолекулярный лиганд в группах 3 и 4 заменял глутаровый линкер, показанный на фиг. 5, линкером, который включал связь цистеин-ПЭГ<sub>2</sub>, представленную следующим образом:



Дозу вводили пяти (5) крысам в каждой из групп 1, 2, 3, 4, 5 и 7 (n=5) и четырем (4) крысам в группе 6. Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 10

Средняя относительная экспрессия мРНК rENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 6

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК rENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,082	0,089

Группа 2 (1,5 мг/кг AD04835-Tri-SM1)	0,453	0,098	0,126
Группа 3 (1,5 мг/кг AD04835-PEG <sub>2</sub> -Cys-Tri-SM1)	0,365	0,076	0,095
Группа 4 (1,5 мг/кг AD07065-PEG <sub>2</sub> -Cys-Tri-SM1)	0,412	0,136	0,204
Группа 5 (1,5 мг/кг AD05345-Tri-SM1)	0,404	0,097	0,128
Группа 6 (1,5 мг/кг AD05347-Tri-SM1)	0,311	0,048	0,057
Группа 7 (1,5 мг/кг AD05453-Cys-ПЭГ <sub>20</sub> кДа-пептидный линкер-ПЭГ <sub>20</sub> -три-пептидный лиганд)	0,354	0,078	0,101

Как показано в табл. 10 выше, каждое из альфа-ENaC средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем. Кроме того, применение тридентатного низкомолекулярного лиганда, направленно взаимодействующего с  $\alpha\upsilon\beta\delta$  эпителиальных клеток, показывает сопоставимое снижение экспрессии мРНК по сравнению с лигандом на пептидной основе, направленно взаимодействующим с  $\alpha\upsilon\beta\delta$  эпителиальных клеток, который дополнительно включал модификатор ФК, ПЭГ массой 20 кДа.

Пример 7. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 11.

Таблица 11

Группы введения доз крысам в примере 7

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05458, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05459, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05562, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05563, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05564, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
8	0,5 мг/кг AD05565, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
9	0,5 мг/кг AD05567, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
10	0,5 мг/кг AD05570, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta\delta$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta\delta$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM2 в каждой из групп 2-6 и 8-10, имеет структуру, представленную на фиг. 4, который конъюгирован со средством РНКи через концевой амин (т.е. путем образования кова-

лентной связи с концевой группой NH<sub>2</sub>-C6) на 5'-конце смысловой цепи. Лиганд для группы 7 включал цистеиновую соединительную группу (см., например, пример 6).

Дозы вводили четырем (4) крысам в группах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 9 (n=4) и трем (3) крысам в группах 8 и 10 (n=3). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обеих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ЕNaС (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 12  
Средняя относительная экспрессия мРНК гЕNaС на момент умерщвления (день 9) в примере 7

Группы	Количество крыс (n=)	Средняя относительная экспрессия мРНК гЕNaС	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	4	1,000	0,041	0,043
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347)	4	0,457	0,088	0,109
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05458)	4	0,708	0,055	0,059
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05459)	4	0,753	0,174	0,227
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05562)	4	0,608	0,056	0,062
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05563)	4	0,621	0,048	0,053
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05564)	4	0,569	0,095	0,114
Группа 8 (0,5 мг/кг AD05565)	3	0,627	0,066	0,073
Группа 9 (0,5 мг/кг AD05567)	4	0,638	0,087	0,100
Группа 10 (0,5 мг/кг AD05570)	3	0,645	0,123	0,151

Как показано в табл. 12 выше, каждое из альфа-ЕNaС средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем. Например, AD05347 показало приблизительно 54% снижение (0,457) средней экспрессии мРНК гЕNaС по сравнению с контролем.

Пример 8. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ЕNaС средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуэли путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 13.

Таблица 13  
Группы введения доз крысам в примере 8

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM2), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM9), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM8), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

8	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
9	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM10), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
10	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM11), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
11	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным лигандом на пептидной основе, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta6$ эпителиальных клеток, на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3–6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM2 в группах 2 и 4, имеет структуру, представленную на фиг. 4. Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 3 и 8, имеет структуру, представленную на фиг. 6. Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM9 в группе 5, имеет структуру, представленную на фиг. 7. Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6 в группе 6, имеет структуру, представленную на фиг. 8. Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM8 в группе 7, имеет структуру, представленную на фиг. 9. Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM10 в группе 9, имеет структуру, представленную на фиг. 10. И тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM11 в группе 10, имеет структуру, представленную на фиг. 11. Каждый из соответствующих тридентатных низкомолекулярных лигандов, направленно взаимодействующих с  $\alpha\upsilon\beta6$  эпителиальных клеток, добавляли путем конъюгирования через аминогруппу на 5'-конец соответствующего альфа-ENaC средства РНКи.

В каждой группе вводили дозы четырем (4) крысам ( $n=4$ ). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обеих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое,  $\pm 95\%$  доверительный интервал).

Таблица 14  
Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 8

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,162	0,193
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347-Tri-SM2)	0,469	0,101	0,129
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05347-Tri-SM6.1)	0,358	0,078	0,100
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM2)	0,562	0,086	0,102
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM9)	0,620	0,168	0,230
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6)	0,559	0,099	0,120
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM8)	0,691	0,072	0,081
Группа 8 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,454	0,055	0,063
Группа 9 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM10)	0,454	0,080	0,097
Группа 10 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM11)	0,577	0,113	0,140
Группа 11 (0,5 мг/кг AD05453-тридентатный пептидный лиганд)	0,558	0,057	0,064

Как показано в табл. 14 выше, каждое из альфа-ENaC средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем. Например, AD05347-Tri-SM6.1 (группа 3) показало приблизительно 64% снижение (0,358) средней экспрессии мРНК гENaC по сравнению с контролем, и AD05453-Tri-SM6.1 (группа 8) показало приблизительно 55% снижение (0,454) средней экспрессии мРНК гENaC по сравнению с контролем. Кроме того, группы 8 и 9 достигли приблизительно 55% снижения (0,454) средней экспрессии мРНК гENaC без использования 5'-концевой циклопропил-фосфонатной модификации на антисмысловой цепи и показали ингибирующий эффект, сопоставимый с группой 2, в которой

наблюдали приблизительно 53% снижение (0,469) средней экспрессии мРНК гЕНaС с 5'-антисмысловой циклопропил-фосфонатной модификацией. Кроме того, как наблюдали в группах 4, 6, 8, 9 и 10, триден-татные низкомолекулярные лиганды, направленно взаимодействующие с  $\alpha\beta6$  эпителиальных клеток, были сопоставимы или в некоторых случаях в числовом выражении превосходили группу 11 (например, группы 8 и 9, которые включали Tri-SM6.1 и Tri-SM10), в которой использовали триден-татный лиганд на пептидной основе, направленно взаимодействующий с  $\alpha\beta6$  эпителиальных клеток, который, как известно, обладал аффинностью к интегину  $\alpha\beta6$  (см. фиг. 11 в публикации международной патентной заявки WO 2018/085415 для получения информации о химической структуре).

Пример 9. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ЕНaС средств РНКи, конъюги-рованных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуоли путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл, что включало следующие группы введения доз, перечисленные в табл. 15.

Таблица 15

Группы введения доз крысам в примере 9

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05453 без направляющего лиганда (т.е. "голое средство РНКи"), приготовленного в солевом растворе	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM7), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05618, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05562, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05564, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
8	0,5 мг/кг AD05567, конъюгированного с триден-татным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Триден-татный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 3 и 5-8, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили четырем (4) крысам в каждой группе (n=4). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ЕНaС (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 16

Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС на момент умерщвления (день 9) в примере 9

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,00	0,180	0,219
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05453)	0,713	0,139	0,173
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,562	0,082	0,096
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM7)	0,768	0,059	0,064
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05618-Tri-SM6.1)	0,524	0,074	0,086
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05562-Tri-SM6.1)	0,784	0,07	0,077
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05564-Tri-SM6.1)	0,921	0,104	0,117
Группа 8 (0,5 мг/кг AD05567-Tri-SM6.1)	0,707	0,084	0,096

Как показано в табл. 16 выше, каждое из альфа-ЕНaС средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем. Кроме того, при введении в форме голы РНК AD05453 показало лишь приблизительно 29% ингибирование (0,713), тогда как при конъюгировании с Tri-SM6.1 интегрин-направляющим лигандом оно показало 44% снижение (0,562) средней экспрессии мРНК гЕНaС.

Пример 10. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ЕНaС средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл, что включало следующие группы введения доз, перечисленные в табл. 17.

Таблица 17

Группы введения доз крысам в примере 10

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05671, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

5	0,5 мг/кг AD05672, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05673, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05558, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
8	0,5 мг/кг AD05560, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
9	0,5 мг/кг AD05611, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
10	0,5 мг/кг AD05613, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta 6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-10, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили четырем (4) крысам в каждой группе (n=4). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обеих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 18

Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 10

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,084	0,092
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347-Tri-SM6.1)	0,375	0,128	0,194
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,597	0,163	0,224
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05671-Tri-SM6.1)	0,663	0,062	0,068
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05672-Tri-SM6.1)	0,808	0,114	0,133
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05673-Tri-SM6.1)	0,623	0,100	0,119
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05558-Tri-SM6.1)	0,533	0,043	0,047
Группа 8 (0,5 мг/кг AD05560-Tri-SM6.1)	0,647	0,122	0,150
Группа 9 (0,5 мг/кг AD05611-Tri-SM6.1)	0,477	0,067	0,078
Группа 10 (0,5 мг/кг AD05613-Tri-SM6.1)	0,640	0,165	0,223

Как показано в табл. 18 выше, каждое из альфа-ENaC средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем.

Пример 11. Орофарингеальное аспирационное введение in vivo альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл, что включало следующие группы введения доз, перечисленные в табл. 19.

Таблица 19

## Группы введения доз крысам в примере 11

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05618, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05619, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05622, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05623, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-7, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили пяти (5) крысам в каждой группе (n=5). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 20

## Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 11

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,195	0,242
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347-Tri-SM6.1)	0,383	0,041	0,046
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,489	0,168	0,257
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05618-Tri-SM6.1)	0,770	0,185	0,244
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05619-Tri-SM6.1)	0,719	0,080	0,090
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05622-Tri-SM6.1)	0,564	0,168	0,239
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05623-Tri-SM6.1)	0,575	0,115	0,144

Как показано в табл. 20 выше, каждое из альфа-ENaC средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем.

Пример 12. Орофарингеальное аспирационное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, крысам.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Дуули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 21.

Группы введения доз крысам в примере 12

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,5 мг/кг AD05347, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,5 мг/кг AD05683, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05684, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,5 мг/кг AD05685, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	0,5 мг/кг AD05686, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
8	0,5 мг/кг AD05687, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
9	0,5 мг/кг AD05564, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
10	0,5 мг/кг AD05688, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
11	0,5 мг/кг AD05689, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
12	0,5 мг/кг AD05690, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
13	0,5 мг/кг AD05691, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta 6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-13, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили четырем (4) крысам в каждой группе (n=4). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, норма-

лизованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 22

Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС на момент умерщвления (день 9) в примере 12

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,157	0,186
Группа 2 (0,5 мг/кг AD05347-Tri-SM6.1)	0,534	0,066	0,075
Группа 3 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,573	0,086	0,101
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05683-Tri-SM6.1)	0,547	0,052	0,057
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05684-Tri-SM6.1)	0,755	0,158	0,200
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05685-Tri-SM6.1)	0,609	0,077	0,089
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05686-Tri-SM6.1)	0,591	0,077	0,089
Группа 8 (0,5 мг/кг AD05687-Tri-SM6.1)	0,624	0,099	0,118
Группа 9 (0,5 мг/кг AD05564-Tri-SM6.1)	0,787	0,172	0,221
Группа 10 (0,5 мг/кг AD05688-Tri-SM6.1)	0,563	0,072	0,082
Группа 11 (0,5 мг/кг AD05689-Tri-SM6.1)	0,693	0,136	0,169
Группа 12 (0,5 мг/кг AD05590-Tri-SM6.1)	0,651	0,159	0,211
Группа 13 (0,5 мг/кг AD05691-Tri-SM6.1)	0,870	0,132	0,155

Как показано в табл. 22 выше, каждое из альфа-ЕНaС средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем.

Пример 13. Исследование с подбором дозы орофарингеального аспирационного введения альфа-ЕНaС средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, на крысах.

В день исследования 1 самцам крыс линии Спрэг-Доули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 23.

Таблица 23

Группы введения доз крысам в примере 13

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	Однократная ОФ доза в день 1
2	0,0625 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
3	0,125 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
4	0,25 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
5	0,5 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
6	0,75 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
7	1,0 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1
8	3,0 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1) на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	Однократная ОФ доза в день 1

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Триденатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-8, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили шести (6) крысам в каждой из групп 1, 2, 3, 4, 7 и 8 ( $n=5$ ). Четырем крысы вводили дозы в группах 5 и 6 ( $n=4$ ). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 24  
Средняя относительная экспрессия мРНК rENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 13

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК rENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,111	0,125
Группа 2 (0,0625 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,695	0,083	0,095
Группа 3 (0,125 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,747	0,139	0,171
Группа 4 (0,25 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,631	0,080	0,092
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,492	0,034	0,037
Группа 6 (0,75 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,485	0,113	0,147
Группа 7 (1,0 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,433	0,077	0,094
Группа 8 (3,0 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,324	0,052	0,062

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Как показано в табл. 24 выше, альфа-ENaC средство РНКи AD05453 показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем при каждом из уровней вводимых доз.

Пример 14. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи мышам.

В дни исследования 1 и 2 самцам мышей ICR с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили 50 мкл изотонического солевого раствора для использования в качестве контроля или 5 мг/кг одного из следующих альфа-ENaC средств РНКи без конъюгированного лиганда (т.е. "голое средство РНКи"), приготовленных в изотоническом солевом растворе: AD04025, AD04526, AD04527, AD04528, AD04529, AD04530, AD04531, AD04536 или AD04537. В каждой группе дозу вводили 4 мышам ( $n=4$ ). Мышей умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 25  
Средняя относительная экспрессия мРНК mENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 14

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК mENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,117	0,132
Группа 2 (0,5 мг/кг AD04025)	0,451	0,097	0,123
Группа 3 (0,5 мг/кг AD04526)	0,585	0,108	0,132
Группа 4 (0,5 мг/кг AD04527)	0,403	0,101	0,134
Группа 5 (0,5 мг/кг AD04528)	0,498	0,117	0,153
Группа 6 (0,5 мг/кг AD04529)	0,480	0,042	0,047
Группа 7 (0,5 мг/кг AD04530)	0,670	0,006	0,006
Группа 8 (0,5 мг/кг AD04531)	0,662	0,103	0,122
Группа 9 (0,5 мг/кг AD04536)	0,746	0,101	0,117
Группа 10 (0,5 мг/кг AD04537)	0,409	0,021	0,022

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Как показано в табл. 25 выше, каждое из альфа-ENaC средств РНКи показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем.

Пример 15. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи мышам.

В дни исследования 1 и 2 самцам мышей ICR с помощью микрораспылительного устройства (Penn

Century, Philadelphia, PA) вводили 50 мкл изотонического солевого раствора для использования в качестве контроля или 5 мг/кг одного из следующих альфа-ENaC средств РНКи без конъюгированного лиганда (т.е. "голое средство РНКи"), приготовленного в изотоническом солевом растворе: AD04025, AD04538, AD04539, AD04532, AD04533, AD04534, AD04535 или AD04540 (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере).

В каждой группе вводили дозы четырем (4) мышам (n=4). Мышей умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 26  
Средняя относительная экспрессия мРНК mENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 15

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК mENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,081	0,088
Группа 2 (0,5 мг/кг AD04025)	0,448	0,097	0,125
Группа 3 (0,5 мг/кг AD04538)	0,855	0,101	0,115
Группа 4 (0,5 мг/кг AD04539)	0,833	0,076	0,083
Группа 5 (0,5 мг/кг AD04532)	0,581	0,127	0,162
Группа 6 (0,5 мг/кг AD04533)	0,743	0,041	0,044
Группа 7 (0,5 мг/кг AD04534)	1,006	0,127	0,146
Группа 8 (0,5 мг/кг AD04535)	1,042	0,119	0,134
Группа 9 (0,5 мг/кг AD04540)	0,982	0,111	0,125

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Как показано в табл. 26 выше, исходная последовательность соответствующего альфа-ENaC средства РНКи влияет на уровень достигаемого ингибирования гена ENaC. Например, альфа-ENaC средство РНКи AD04025 включает последовательность антисмысловой цепи, которая предназначена для направленного взаимодействия с положением 972 гена альфа-ENaC (т.е. нуклеотиды 1-19 антисмысловой цепи подобраны так, чтобы они были, по меньшей мере частично, комплементарными гену альфа-ENaC (SEQ ID NO: 1) в положениях 972-990). AD04525 достигло наиболее высокого уровня ингибирования из средств РНКи, протестированных в данном примере, и показало приблизительно 55% нокдаун экспрессии гена (0,448) по сравнению с контролем. Остальные альфа-ENaC средства РНКи были предназначены для направленного взаимодействия с различными положениями на гене, включая альфа-ENaC средства РНКи AD04538 (направленно взаимодействующее с положением гена 973), AD04539 (направленно взаимодействующее с положением гена 999), AD04532 (направленно взаимодействующее с положением гена 1000), AD04533 (также направленно взаимодействующее с положением гена 973), AD04534 (также направленно взаимодействующее с положением гена 999), AD04535 (направленно взаимодействующее с положением гена 1291) и AD04540 (направленно взаимодействующее с положением гена 763). Как показано выше, альфа-ENaC средство РНКи, которое предназначено для направленного взаимодействия с геном в другом положении, может обладать другой ингибирующей активностью (например, сравните уровни нокдауна мРНК альфа-ENaC для AD04025 (положение 972) с AD04538 (положение 973) и AD04533 (положение 973)). Кроме того, при сравнении альфа-ENaC средств РНКи в том же положении (например, AD04539 и AD04534), несмотря на то что обе последовательности содержат исходные нуклеиновые основания, предназначенные для ингибирования гена в том же положении (например, положении гена 999), небольшие модификации исходной последовательности оснований и/или включение других модифицированных нуклеотидов могут привести, по меньшей мере, к другой, отличающейся в целом выражении ингибирующей активности.

Пример 16. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи крысам.

В дни исследования 1 и 2 самцам крыс линии Спрэг-Дуули с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили 200 мкл изотонического солевого раствора для использования в качестве контроля или приблизительно 3 мг/кг одного из следующих альфа-ENaC средств РНКи без конъюгированного лиганда (т.е. "голое средство РНКи"), приготовленного в изотоническом солевом растворе: AD04835, AD04022, AD05116, AD05117, AD05118 или AD05119 (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере).

В каждой группе вводили дозы пяти (5) крысам (n=5). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-

ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 27

Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 16

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,171	0,207
Группа 2 (0,5 мг/кг AD04835)	0,281	0,043	0,050
Группа 3 (0,5 мг/кг AD04022)	0,297	0,055	0,067
Группа 4 (0,5 мг/кг AD05116)	0,554	0,095	0,115
Группа 5 (0,5 мг/кг AD05117)	0,532	0,097	0,119
Группа 6 (0,5 мг/кг AD05118)	0,300	0,034	0,038
Группа 7 (0,5 мг/кг AD05119)	0,496	0,075	0,089

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

В табл. 27 выше приведены дополнительные данные, показывающие, что исходная последовательность соответствующего альфа-ENaC средства РНКи влияет на уровень достигаемого ингибирования гена ENaC. Например, каждое из альфа-ENaC средств РНКи, AD04025 и AD04835, включает последовательность антисмысловой цепи, которая предназначена для направленного взаимодействия с положением 972 гена альфа-ENaC (т.е. нуклеотиды 1-19 антисмысловой цепи подобраны так, чтобы они были, по меньшей мере частично, комплементарными гену альфа-ENaC (SEQ ID NO: 1) в положениях 972-990). Из альфа-ENaC средств РНКи, протестированных в данном примере, эти два средства РНКи показали наиболее высокий уровень нокдауна - больше 70%. Остальные альфа-ENaC средства РНКи были предназначены для направленного взаимодействия с различными положениями на гене, включая альфа-ENaC средства РНКи AD05116 (направленно взаимодействующее с положением гена 944), AD05117 (направленно взаимодействующее с положением гена 945), AD05118 (направленно взаимодействующее с положением гена 1289) и AD05119 (направленно взаимодействующее с положением гена 1579).

Пример 17. Исследование с многократным введением и подбором дозы орофарингеального аспирационного введения альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, на крысах.

В день исследования 1, день исследования 2 и день исследования 3 самцам крыс линии Спрэг-Дуули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл согласно следующим группам введения доз, перечисленным в табл. 28.

Таблица 28

Группы введения доз крысам в примере 17

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)
2	0,005 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tg-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)
3	0,01 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tg-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)
4	0,025 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tg-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)
5	0,05 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tg-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)

6	0,10 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)
7	0,50 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\upsilon\beta 6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1, день 2 и день 3 (всего три дозы)

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Как отмечено в настоящем документе, такая же структура конъюгата средства РНКи-тридентатного низкомолекулярного лиганда, направленно взаимодействующего с  $\alpha\upsilon\beta 6$  эпителиальных клеток (т.е. Tri-SM6.1-AD05453), в данном примере может быть альтернативно синтезирована при помощи триалкин-функционализированной соединительной группы (TriAlk14), как показано в AD05924, вместо постсинтетического присоединения к концевой аминогруппе, как показано в AD05453 (см. также пример 1).

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\upsilon\beta 6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-7, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили семи (7) крысам в каждой из групп 1, 2, 3, 4, 5 и 6 (n=7) и шести (6) крысам в группе 7 (n=6). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 29

Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC на момент умерщвления (день 9) в примере 17

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гENaC	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,127	0,146
Группа 2 (0,005 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,852	0,097	0,109
Группа 3 (0,01 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,663	0,103	0,121
Группа 4 (0,025 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,589	0,131	0,168
Группа 5 (0,05 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,480	0,058	0,066
Группа 6 (0,10 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,432	0,056	0,064
Группа 7 (0,50 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,279	0,034	0,039

Как показано в табл. 29 выше, альфа-ENaC средство РНКи AD05453 показало снижение экспрессии мРНК у крыс по сравнению с контролем при каждом из уровней вводимых доз. Кроме того, многократное введение дозы ОФ продемонстрировало признаки дополнительного усиления нокдаун экспрессии мРНК гENaC по сравнению с однократной дозой при использовании того же альфа-ENaC средства РНКи (сравнить, например, группу 7 примера 17 с группой 5 примера 13).

Пример 18. Эндотрахеальное введение *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи мышам и оценка стабильности в человеческой мокроте при ХОБЛ.

Для оценки и сравнения активности и стабильности известного дуплекса предшествующего уровня техники со средствами РНКи, раскрытыми в настоящем документе, синтезировали дуплекс, имеющий следующую модифицированную структуру, как раскрыто в публикации международной патентной заявке WO 2008/152131 (Novartis et al.) (см. табл. 1С в указанной заявке, ND-9201):

последовательность антисмысловой цепи (5'→3'): GAUUUGUUCUGGUUGcAcAdTsdT (SEQ ID NO: 291);

последовательность смысловой цепи (5'→3'): uGuGcAAccAGAAcAAAcudTsdT (SEQ ID NO: 292) (именуемое в дальнейшем ND-9201).

Согласно WO 2008/152131, ND-9201 показало сравнительно мощное ингибирование экспрессии гена альфа-ENaC *in vitro*.

Сначала проводили исследования для оценки активности ингибирования альфа-ENaC *in vivo*. В дни исследования 1 и 2 самцам мышей ICR с помощью микрораспылительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили либо изотонический раствор глюкозы (D5W) для использования в качестве контроля, либо приблизительно 10 мг/кг ND-9201, приготовленного в D5W. Мышей умерщвляли в день 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) количественно определяли с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель. Для сравнения в дни исследования 1 и 2 самцам мышей ICR с помощью микрораспы-

лительного устройства (Penn Century, Philadelphia, PA) вводили либо растворитель D5W для использования в качестве контроля, либо приблизительно 5 мг/кг средства РНКи AD04025, раскрытого в настоящем документе, приготовленного в D5W (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированного дуплекса AD04025). Мышей аналогичным образом умерщвляли в день 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) количественно определяли с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получавшей растворитель.

Для ND-9201 при введении в дозе 10 мг/кг в дни 1 и 2 было достигнуто приблизительно 25% ингибирование экспрессии мРНК mENaC у мышей *in vivo*.

Для AD04025 при введении в дозе всего 5 мг/кг в дни 1 и 2 было достигнуто приблизительно 65% ингибирование экспрессии мРНК mENaC у мышей *in vivo*, что указывает на существенное повышение ингибирующей активности по сравнению с известным дуплексом ND-9201 из предшествующего уровня техники.

Кроме того, исследования для оценки стабильности проводили с ND-9201 и AD04858 в человеческой мокроте, взятой у пациентов с диагнозом ХОБЛ (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированного дуплекса AD04858). Раствор, содержащий 50 мкл мокроты и 350 мкл лизисного буфера, перемешивали на вортексе, добавляли 12,5 мкл ND-9201 или AD04858 и быстро перемешивали на вортексе каждый час. ЖХМС проводили на образцах для определения оставшегося полноразмерного продукта смысловой цепи и антисмысловой цепи каждой из молекул с течением времени. Через 6 ч AD04858 показал улучшенную стабильность, поскольку он демонстрировал приблизительно на 20-30% более высокое содержание полноразмерного продукта для смысловой цепи и антисмысловой цепи.

Пример 19. Исследование орофарингеального аспирационного введения *in vivo* альфа-ENaC средств РНКи, конъюгированных с лигандами, направленно взаимодействующими с эпителиальными клетками, на крысах.

В день исследования 1 и день исследования 2 самцам крыс линии Спрэг-Доули путем орофарингеального аспирационного введения (ОФ) при использовании пипетки вводили 200 мкл, что включало следующие группы введения доз, перечисленные в табл. 30.

Таблица 30

Группы введения доз крыс в примере 19

Группа	Средство РНКи и доза	Схема введения доз
1	Изотонический солевой раствор (без средства РНКи)	ОФ доза в день 1 и день 2
2	0,025 мг/кг AD05625, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1 и день 2
3	0,50 мг/кг AD05453, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1 и день 2
4	0,50 мг/кг AD05829, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1 и день 2
5	0,50 мг/кг AD05831, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1 и день 2
6	0,50 мг/кг AD05833, конъюгированного с тридентатным низкомолекулярным лигандом, направленно взаимодействующим с $\alpha\beta6$ эпителиальных клеток (Tri-SM6.1), на 5'-конце смысловой цепи, приготовленного в солевом растворе.	ОФ доза в день 1 и день 2

(См., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированных дуплексов, используемых в данном примере.)

Тридентатный низкомолекулярный лиганд, направленно взаимодействующий с  $\alpha\beta6$  эпителиальных клеток, называемый Tri-SM6.1 в группах 2-7, имеет структуру, представленную на фиг. 6.

Дозы вводили четырем (4) крысам в каждой группе (n=7). Крыс умерщвляли в день исследования 9 и выделяли суммарную РНК из обоих легких после сбора и гомогенизации. Экспрессию мРНК альфа-ENaC (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в процентах от значения контрольной группы, получав-

шей растворитель (среднее геометрическое, +/-95% доверительный интервал).

Таблица 31

Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС на момент умерщвления (день 9) в примере 19

Группы	Средняя относительная экспрессия мРНК гЕНaС	Низкая (ошибка)	Высокая (ошибка)
Группа 1 (изотонический солевой раствор)	1,000	0,196	0,243
Группа 2 (0,25 мг/кг AD05625-Tri-SM6.1)	0,663	0,107	0,127
Группа 3 (0,50 мг/кг AD05453-Tri-SM6.1)	0,490	0,091	0,111
Группа 4 (0,50 мг/кг AD05829-Tri-SM6.1)	0,767	0,163	0,207
Группа 5 (0,50 мг/кг AD05831-Tri-SM6.1)	0,542	0,113	0,142
Группа 6 (0,50 мг/кг AD05833-Tri-SM6.1)	0,599	0,025	0,026

В табл. 31 выше каждое альфа-ЕНaС средство РНКи, AD05625 и AD05453 включало антисмысловую цепь, которая была предназначена для направленного взаимодействия с геном альфа-ЕНaС, начиная с положения 972 (см. SEQ ID NO: 1); AD05829 включало антисмысловую цепь, которая была предназначена для направленного взаимодействия с геном альфа-ЕНaС, начиная с положения 944; AD05831 включало антисмысловую цепь, которая была предназначена для направленного взаимодействия с геном альфа-ЕНaС, начиная с положения 973; и AD01289 включало антисмысловую цепь, которая была предназначена для направленного взаимодействия с геном альфа-ЕНaС, начиная с положения 1289. Каждое альфа-ЕНaС средство РНКи показало ингибирование экспрессии гена, при этом средство РНКи AD05453 показало сравнительно мощное ингибирование альфа-ЕНaС.

Пример 20. Наружное глазное применение *in vivo* альфа-ЕНaС средств РНКи у мышей.

Для оценки способности альфа-ЕНaС средств РНКи ингибировать экспрессию мРНК альфа-ЕНaС в поверхностном эпителии глаза мыши CB57B1/6 (n=3/группа) два раза в день наружно получали глазные инстилляции солевого раствора или 400 мкг AD04858 (в объеме два мкл) в оба глаза в течение пяти дней (см., например, табл. 3-6 для получения информации о химической структуре для химически модифицированного дуплекса AD04858). В пятый день исследования мышей умерщвляли, образцы эпителия конъюнктивы собирали и выделяли суммарную РНК из гомогената ткани. Экспрессию мРНК альфа-ЕНaС (SCNN1A) определяли количественно с помощью количественной ПЦР на основе зондов, нормализованной по экспрессии GAPDH, и выражали в виде процента от значения контрольной группы, получавшей растворитель.

Через пять дней наружного применения два раза в день AD04858 образцы конъюнктивы получавших лечение мышей экспрессировали значительно меньшее количество (приблизительно 24%) мРНК альфа-ЕНaС, чем образцы контрольных животных, получавших растворитель.

#### Другие варианты осуществления

Следует понимать, что хотя изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство РНКи для ингибирования экспрессии гена альфа-ЕНaС, включающее антисмысловую цепь, включающую нуклеотидную последовательность (5'→3') UAUUUGUUCUG-GUUGCACAGG (SEQ ID NO: 3); и смысловую цепь, включающую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70% комплементарна антисмысловой цепи, где все или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.
2. Средство РНКи по п.1, где антисмысловая цепь, смысловая цепь или как антисмысловая, так и смысловая цепи включают по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.
3. Средство РНКи по п.1 или 2, где каждый из модифицированных нуклеотидов независимо выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-нуклеотида, 2'-фтор-нуклеотида, 2'-дезоксид-нуклеотида, 2',3'-секонуклеотидного миметика, закрытого нуклеотида, 2'-F-арабино-нуклеотида, 2'-метоксиэтил-нуклеотида, абазического нуклеотида, рибита, инвертированного нуклеотида, инвертированного 2'-О-метил-нуклеотида, инвертированного 2'-дезоксид-нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, винилфосфонатсодержащих нуклеотидов, циклопропилфосфонатсодержащих нуклеотидов и 3'-О-метил-нуклеотида.
4. Средство РНКи по п.1, где все или по существу все нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-нуклеотиды, 2'-фтор-нуклеотиды или их комбинации.
5. Средство РНКи по любому из пп.1-4, где смысловая цепь включает нуклеотидную последова-

тельность (5'→3') CCUGUGCAACCAGAACAAAUA (SEQ ID NO: 5).

6. Средство РНКи по любому из пп.1-5, где средство РНКи соединено с направляющим лигандом.
7. Средство РНКи по п.6, где направляющий лиганд включает интегрин-направляющий лиганд.
8. Средство РНКи по п.7, где интегрин-направляющий лиганд является  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющим лигандом.
9. Средство РНКи по любому из пп.6-8, где направляющий лиганд конъюгирован со смысловой цепью.
10. Средство РНКи по п.9, где направляющий лиганд конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи.
11. Средство РНКи по п.9, где смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 18-27 нуклеотидов.
12. Средство РНКи по п.11, где смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 18-24 нуклеотида.
13. Средство РНКи по п.12, где смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 21 нуклеотид.
14. Средство РНКи по п.10, где средство РНКи имеет два тупых конца.
15. Средство РНКи по любому из пп.1-14, где смысловая цепь включает один или два концевых кэпа.
16. Средство РНКи по любому из пп.1-15, где смысловая цепь включает один или два инвертированных абазических остатка.
17. Средство РНКи по п.1, где антисмысловая цепь включает нуклеотидную последовательность (5'→3')  
usAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2); или  
cPrpusAfsusUfuGfuUfcUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 10),  
где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин и уридин соответственно, s представляет собой фосфотиоатную связь, и  
cPrpu представляет собой 5'-циклопропил-фосфонат-2'-О-метил-уридин.
18. Средство РНКи по п.17, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaaua (SEQ ID NO: 4), где a, c, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно, и s представляет собой фосфотиоатную связь.
19. Средство РНКи по любому из пп.17, 18, где смысловая цепь средства РНКи соединена с направляющим лигандом.
20. Средство РНКи по п.19, где направляющий лиганд обладает аффинностью в отношении клеточного рецептора, экспрессируемого на эпителиальной клетке.
21. Средство РНКи по п.19, где направляющий лиганд является  $\alpha\beta6$  интегрин-направляющим лигандом.
22. Композиция для применения в лечении заболевания, нарушения или симптома, которые опосредованы, по меньшей мере частично, активностью ENaC и/или экспрессией гена альфа-ENaC, включающая средство РНКи по любому из пп.1-21, где композиция включает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.
23. Композиция по п.22, дополнительно включающая второе средство РНКи для ингибирования экспрессии альфа-ENaC.
24. Композиция по любому из пп.22, 23, дополнительно включающая одно или более дополнительных терапевтических средств.
25. Композиция по п.22, где композиция изготовлена в форме для введения путем ингаляции.
26. Композиция по п.25, где композицию доставляют с помощью дозирующего ингалятора, струйного небулайзера, небулайзера с вибрирующей сеткой или ингалятора Soft Mist.
27. Способ ингибирования экспрессии гена альфа-ENaC в клетке, включающий введение в клетку эффективного количества средства РНКи по любому из пп.1-21 или композиции по любому из пп.22-26.
28. Способ по п.27, где клетка находится в организме субъекта.
29. Способ по п.28, где субъектом является субъект-человек.
30. Способ по любому из пп.27-29, где экспрессия гена альфа-ENaC ингибирована по меньшей мере на приблизительно 30%.
31. Способ лечения одного или более симптомов или заболеваний, связанных с увеличенными или повышенными уровнями активности ENaC, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту-человеку терапевтически эффективного количества композиции по любому из пп.22-26.
32. Способ по п.31, где заболевание является респираторным заболеванием.
33. Способ по п.31, где заболеванием является муковисцидоз, хронический бронхит, немукковисци-

дозный бронхоэктаз, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, инфекции дыхательных путей, первичная цилиарная дискинезия или карцинома легкого при муковисцидозе.

34. Способ по п.31, где заболевание является глазным заболеванием, таким как синдром сухого глаза.

35. Способ по любому из пп.31-34, где средство РНКи вводят в дозе от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 0,500 мг/кг массы тела.

36. Способ по любому из пп.27-35, где средство РНКи вводят в двух или более дозах.

37. Средство РНКи по п.18, где смысловая цепь дополнительно включает инвертированный абазический остаток на 3'-конце.

38. Средство РНКи по п.37, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb) (SEQ ID NO: 178),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

s представляет собой фосфотиоатную связь, и

(invAb) представляет собой инвертированный абазический остаток.

39. Средство РНКи по п.1, где

антисмысловая связь содержит нуклеотидную последовательность (5'→3') usAfsusUfuGfuUf-cUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 2); и

смысловая последовательность содержит нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb) (SEQ ID NO: 178),

где а, с, g, и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

s представляет собой фосфотиоатную связь, и

(invAb) представляет собой инвертированный абазический остаток.

40. Средство РНКи по п.1, где

антисмысловая цепь включает нуклеотидную последовательность (5'→3') cPrpusAfsusUfuGfuUf-cUfgGfuUfgCfaCfaGfsg (SEQ ID NO: 10); и

смысловая цепь включает нуклеотидную последовательность (5'→3') cscugugcaAfCfCfagaacaauas(invAb) (SEQ ID NO: 178),

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метиладенозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтораденозин, цитидин, гуанозин или уридин соответственно,

s представляет собой фосфотиоатную связь, и

cPrpu представляет собой 5'-циклопропилфосфонат-2'-О-метилуридин.

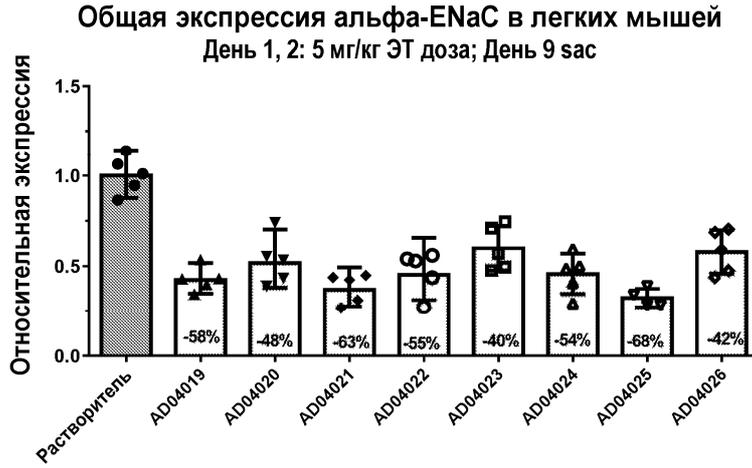
41. Средство РНКи по п.38, где каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 21 нуклеотид.

42. Средство РНКи по п.39, где каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 21 нуклеотид.

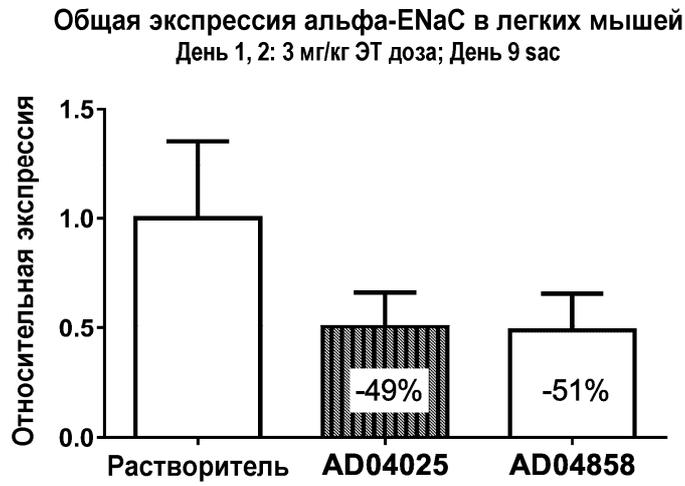
43. Средство РНКи по п.40, где каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь имеют длину 21 нуклеотид.

44. Средство РНКи по п.39, где смысловая цепь средства РНКи связана с направленно взаимодействующим с интегрином  $\alpha v \beta 6$  лигандом.

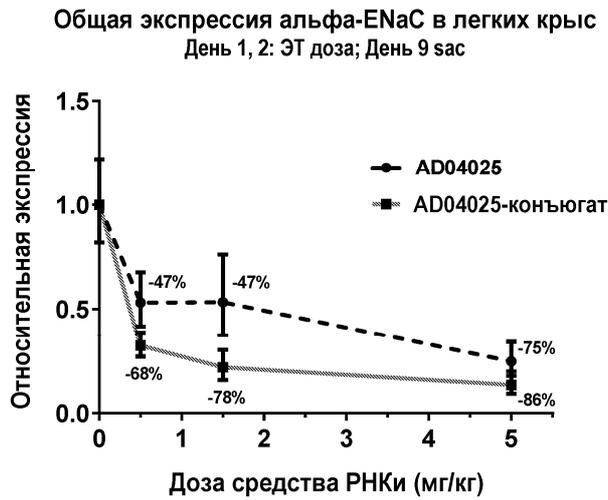
45. Средство РНКи по п.40, где смысловая цепь средства РНКи связана с направленно взаимодействующим с интегрином  $\alpha v \beta 6$  лигандом.



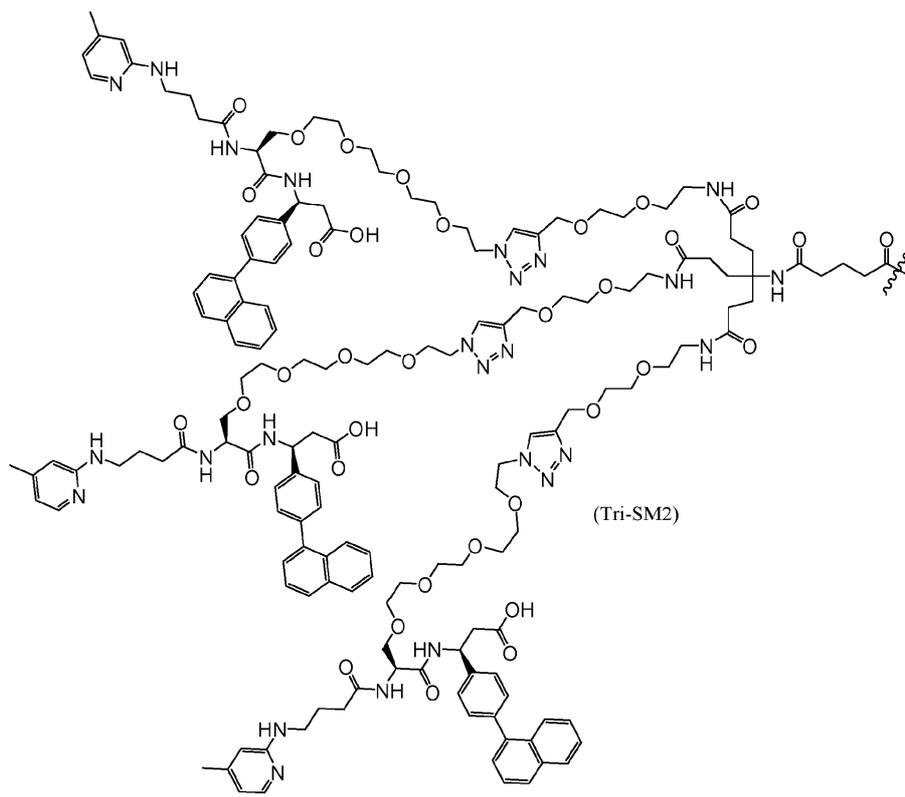
Фиг. 1



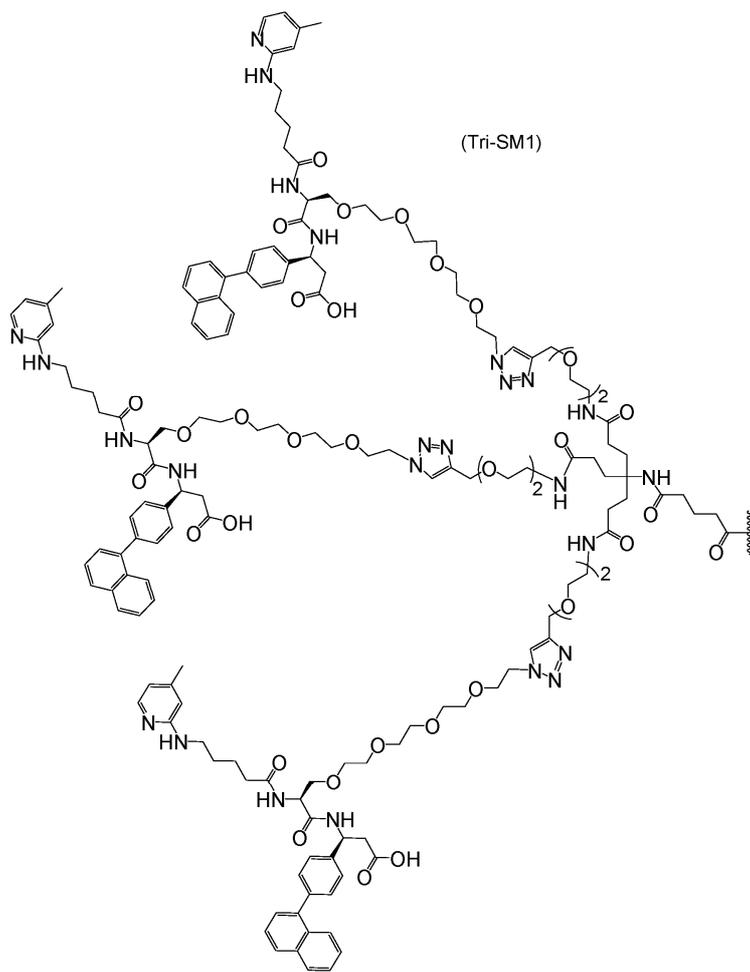
Фиг. 2



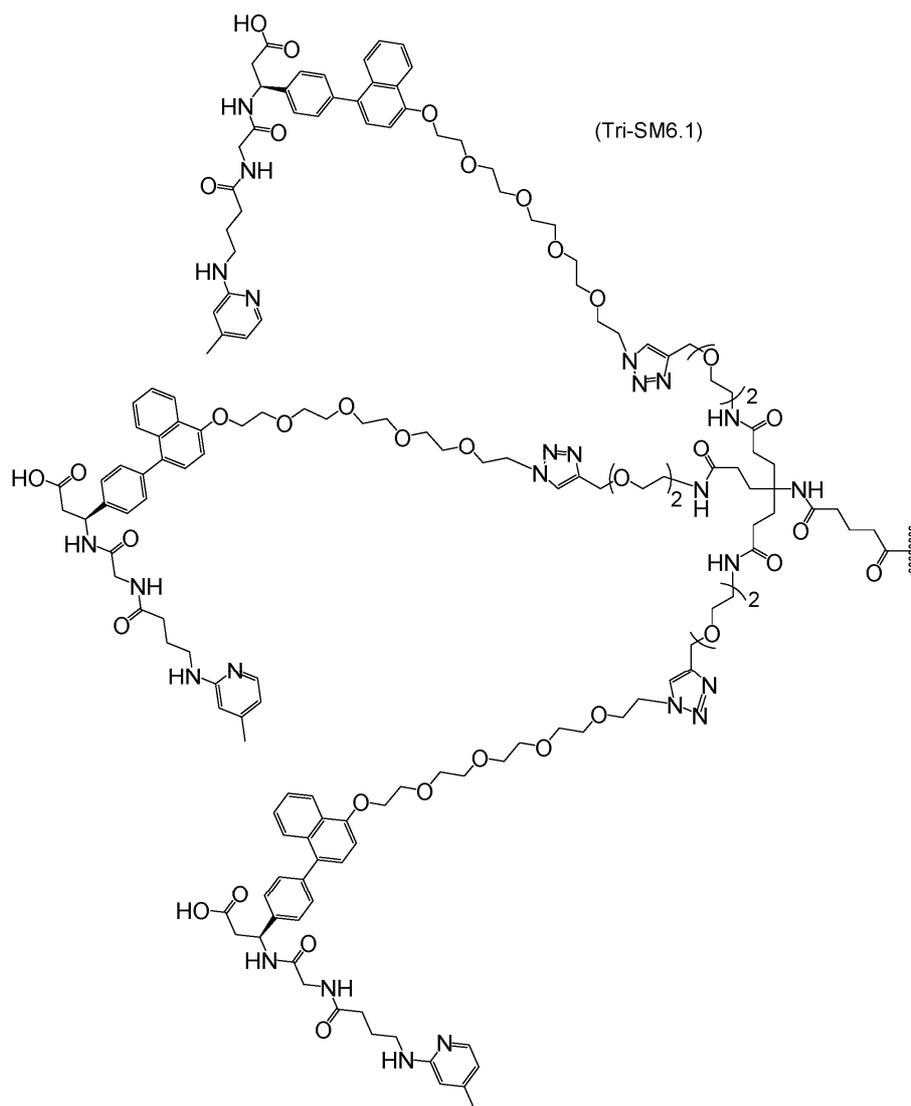
Фиг. 3



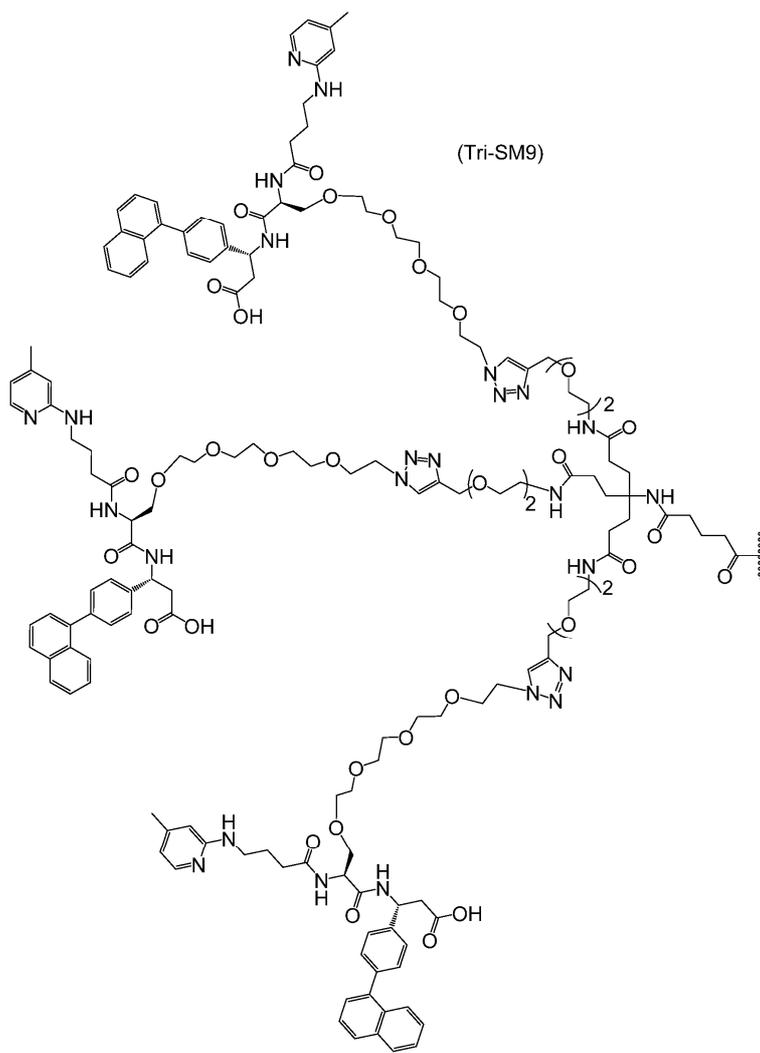
Фиг. 4

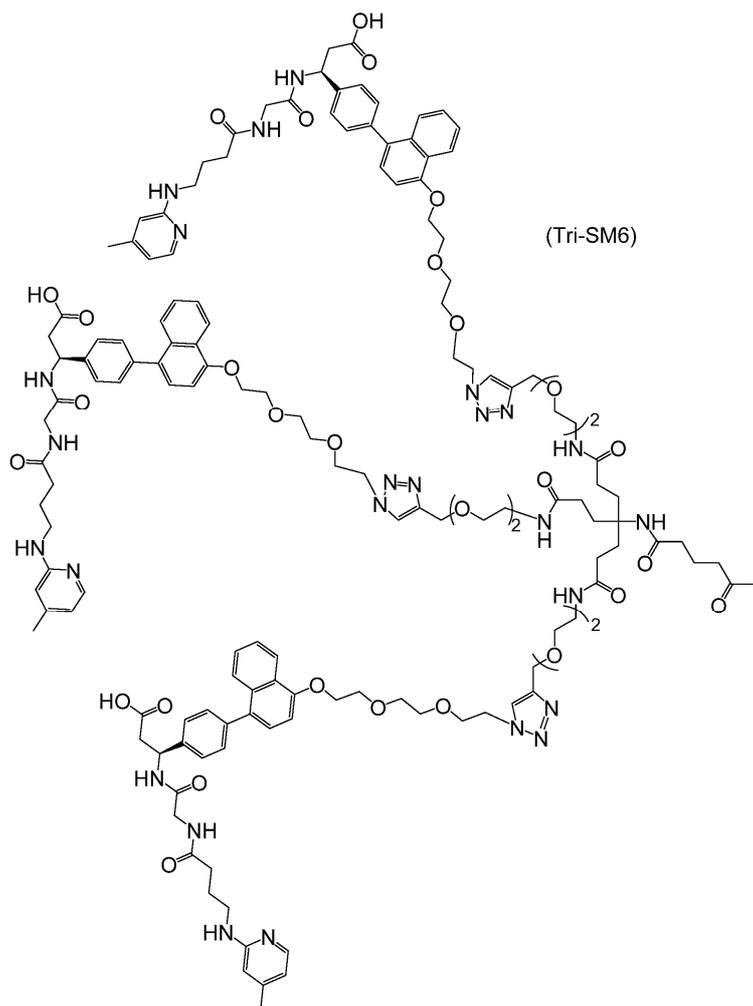


Фиг. 5

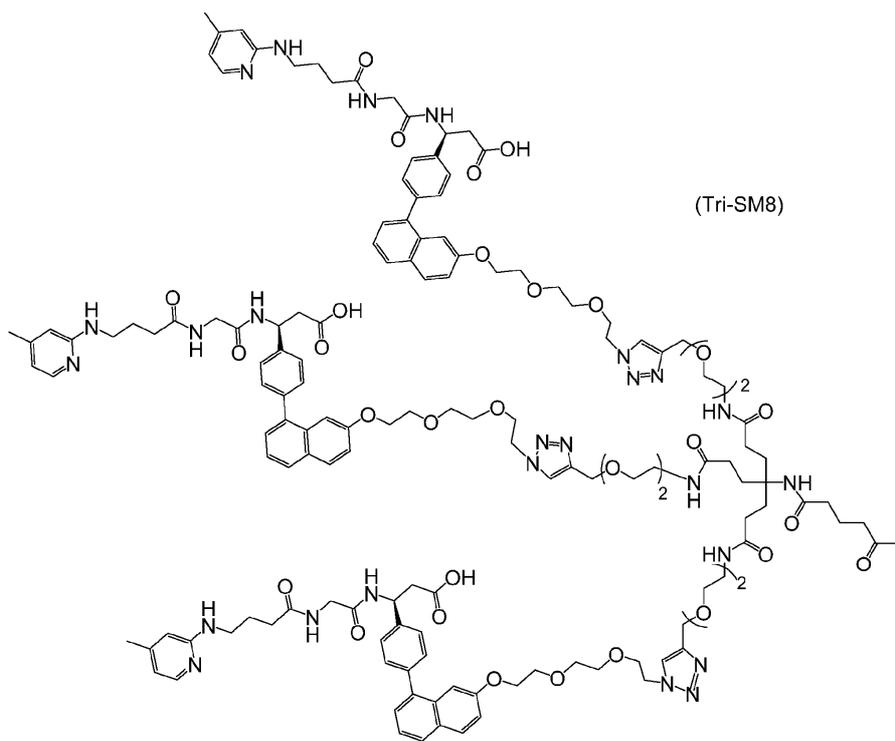


Фиг. 6

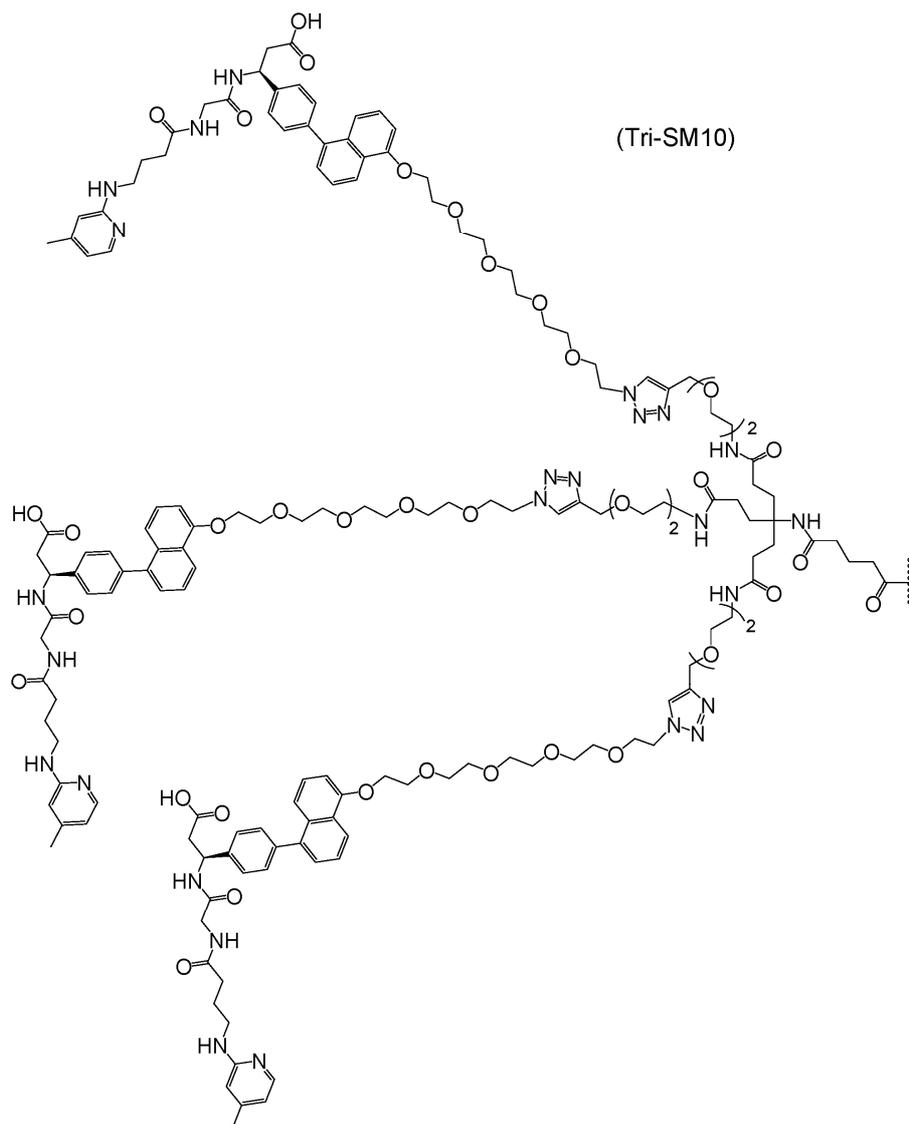




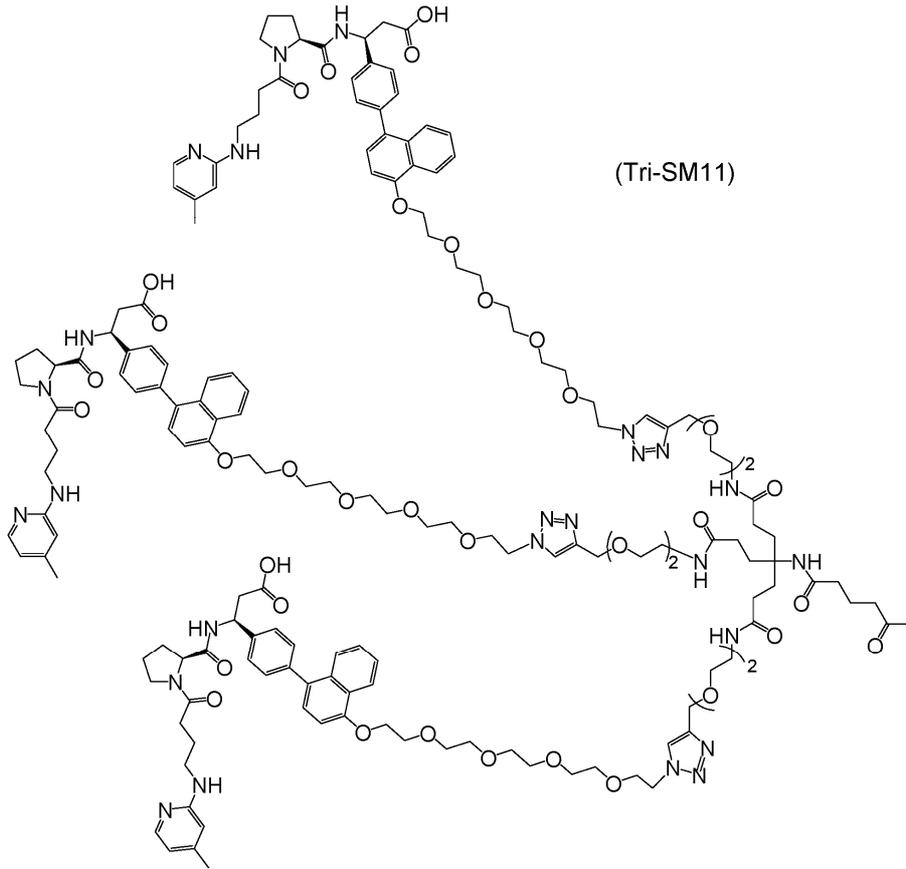
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Антисмысловая цепь (3' ← 5') (AM07200-AS)

Фиг. 12А



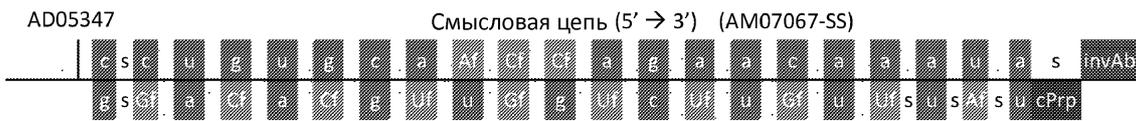
Антисмысловая цепь (3' ← 5') (AM07200-AS)

Фиг. 12В



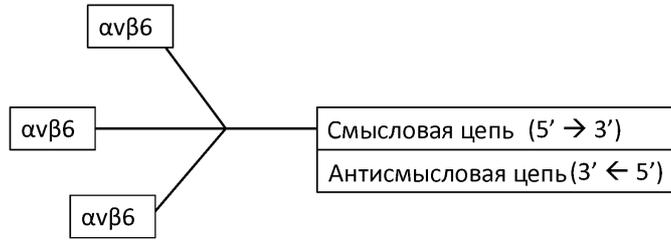
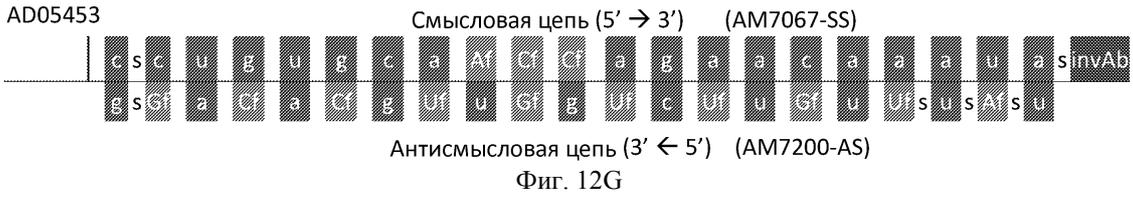
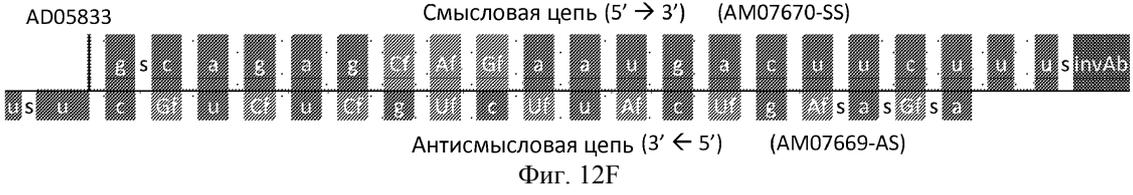
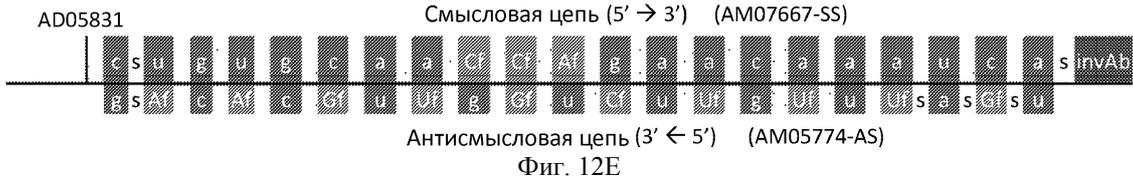
Антисмысловая цепь (3' ← 5') (AM05081-AS)

Фиг. 12С

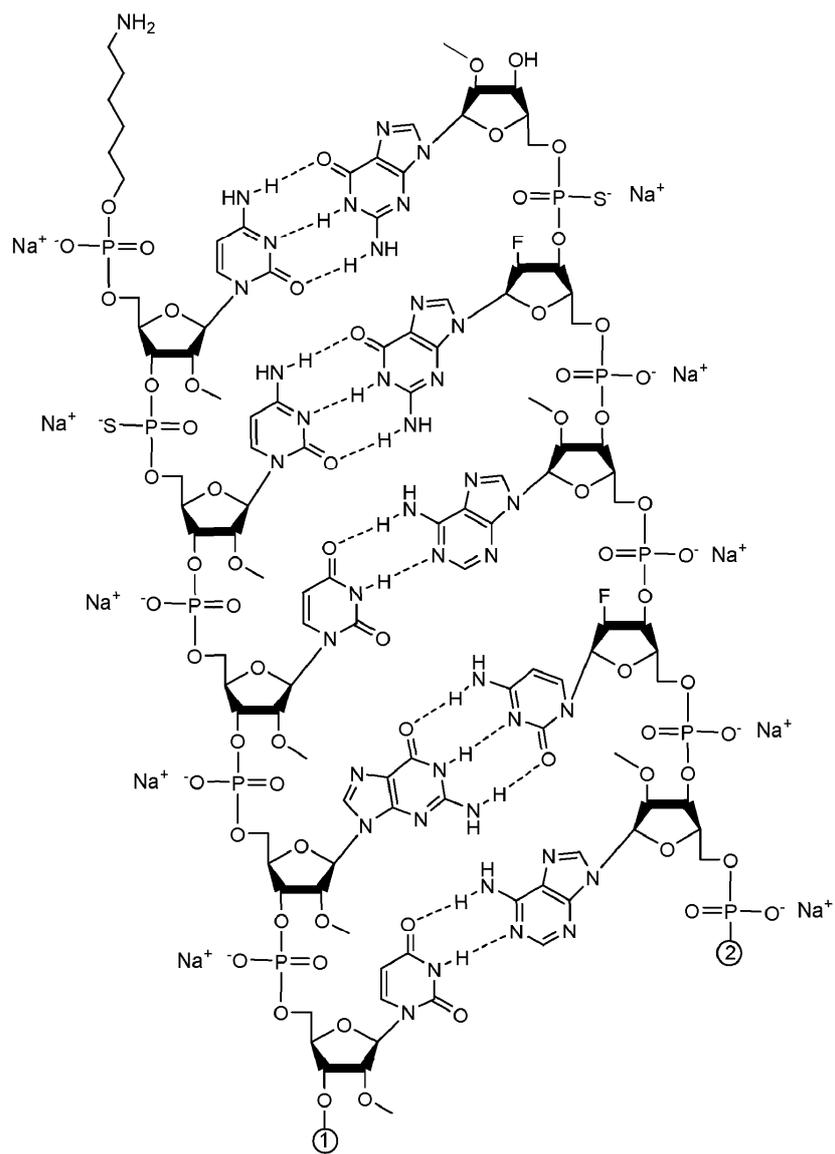


Антисмысловая цепь (3' ← 5') (AM07066-AS)

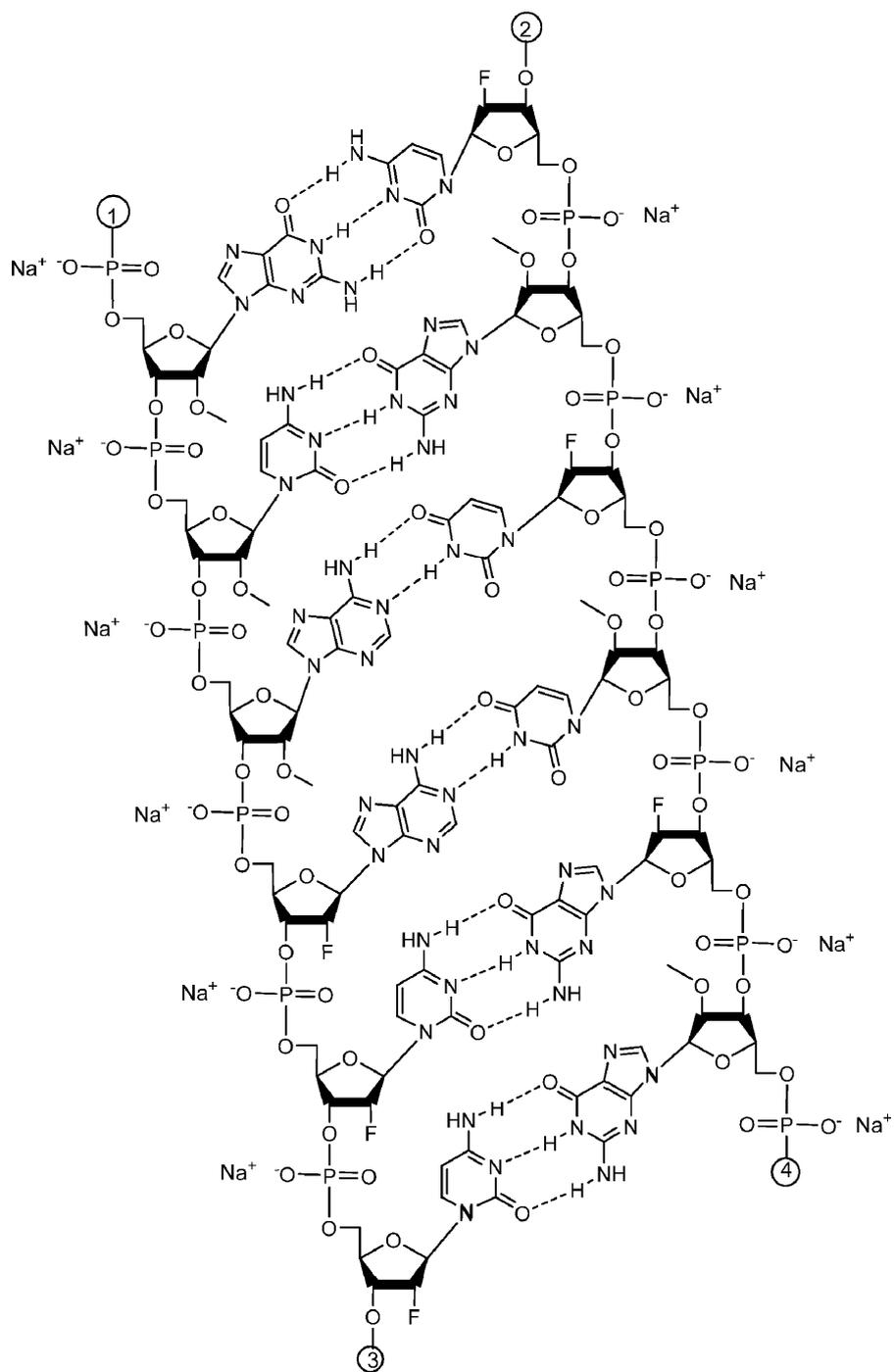
Фиг. 12D



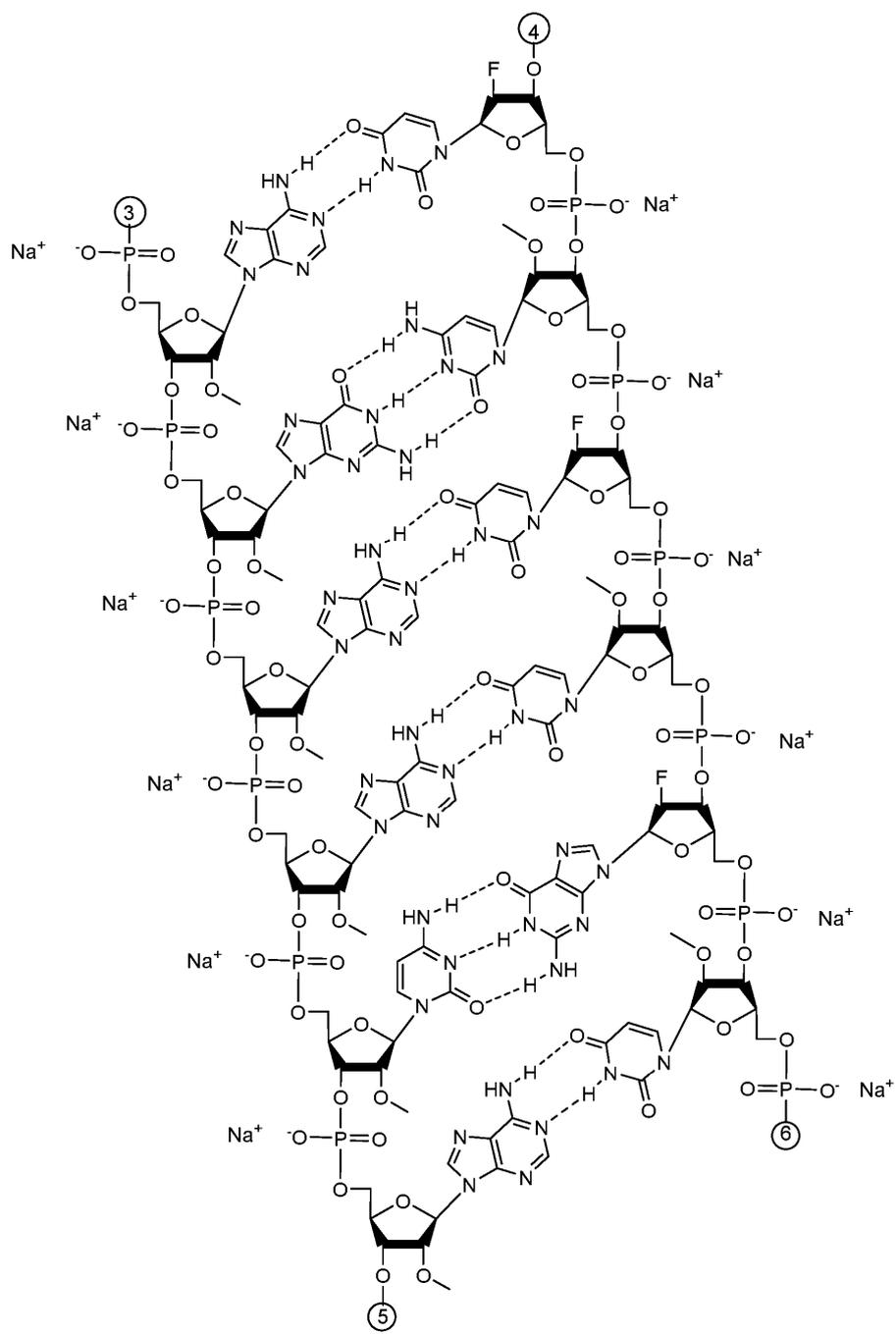
Фиг. 12H



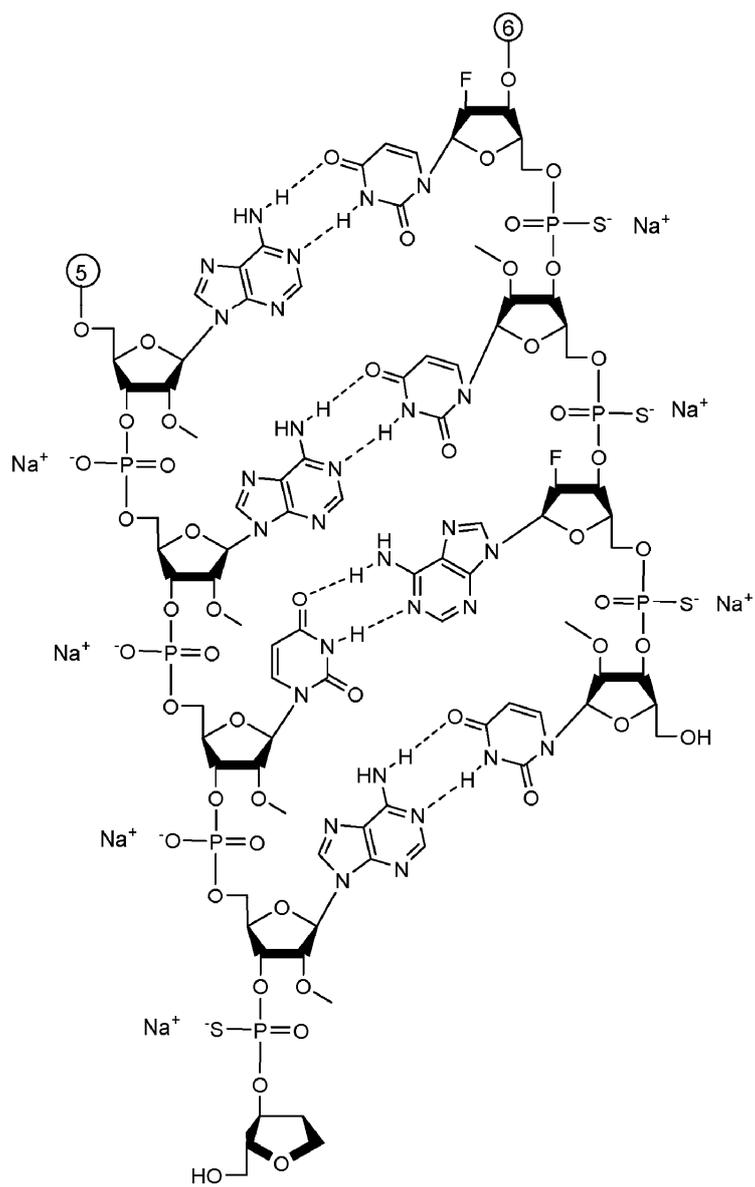
Фиг. 13А



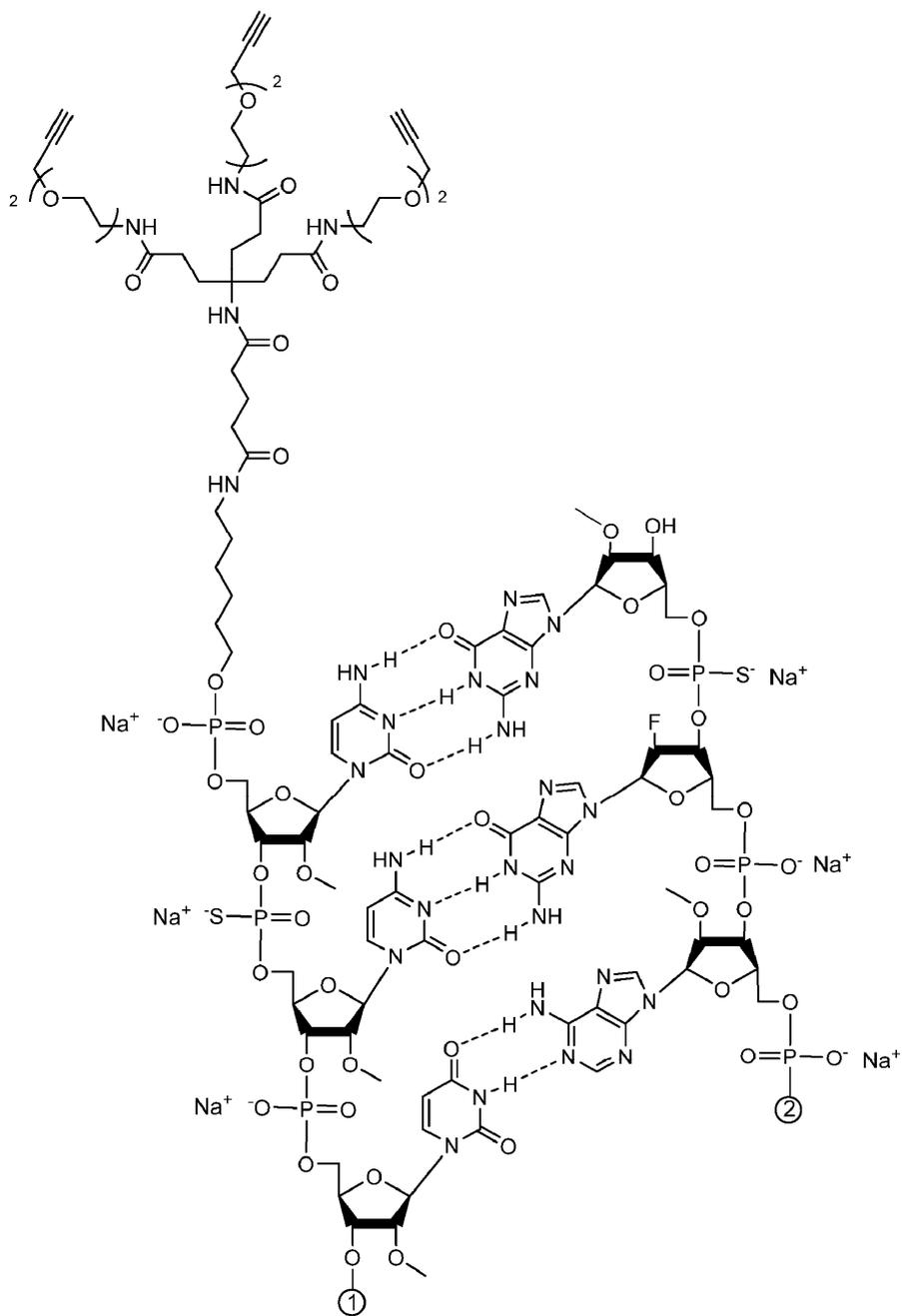
Фиг. 13В



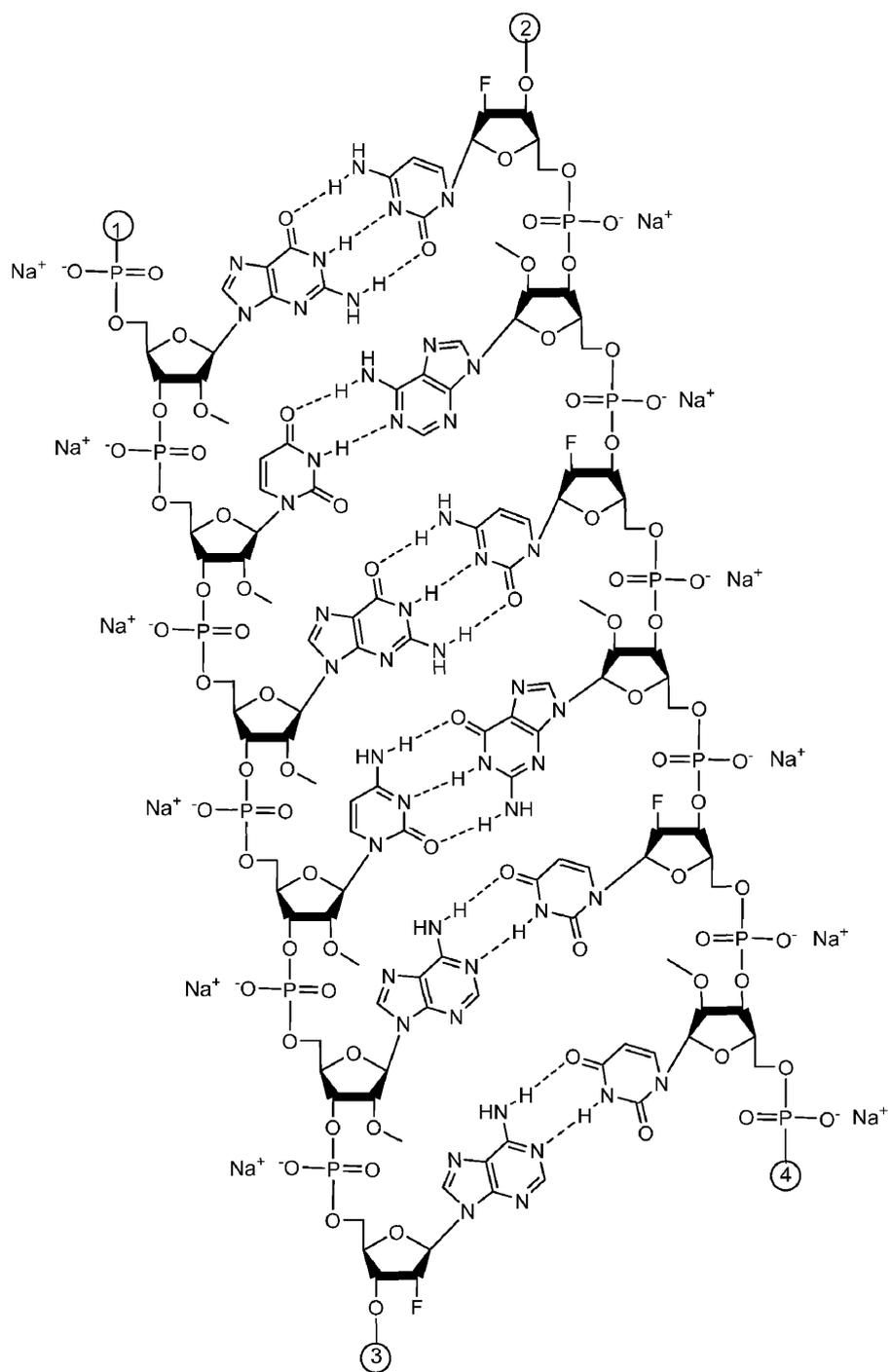
Фиг. 13С



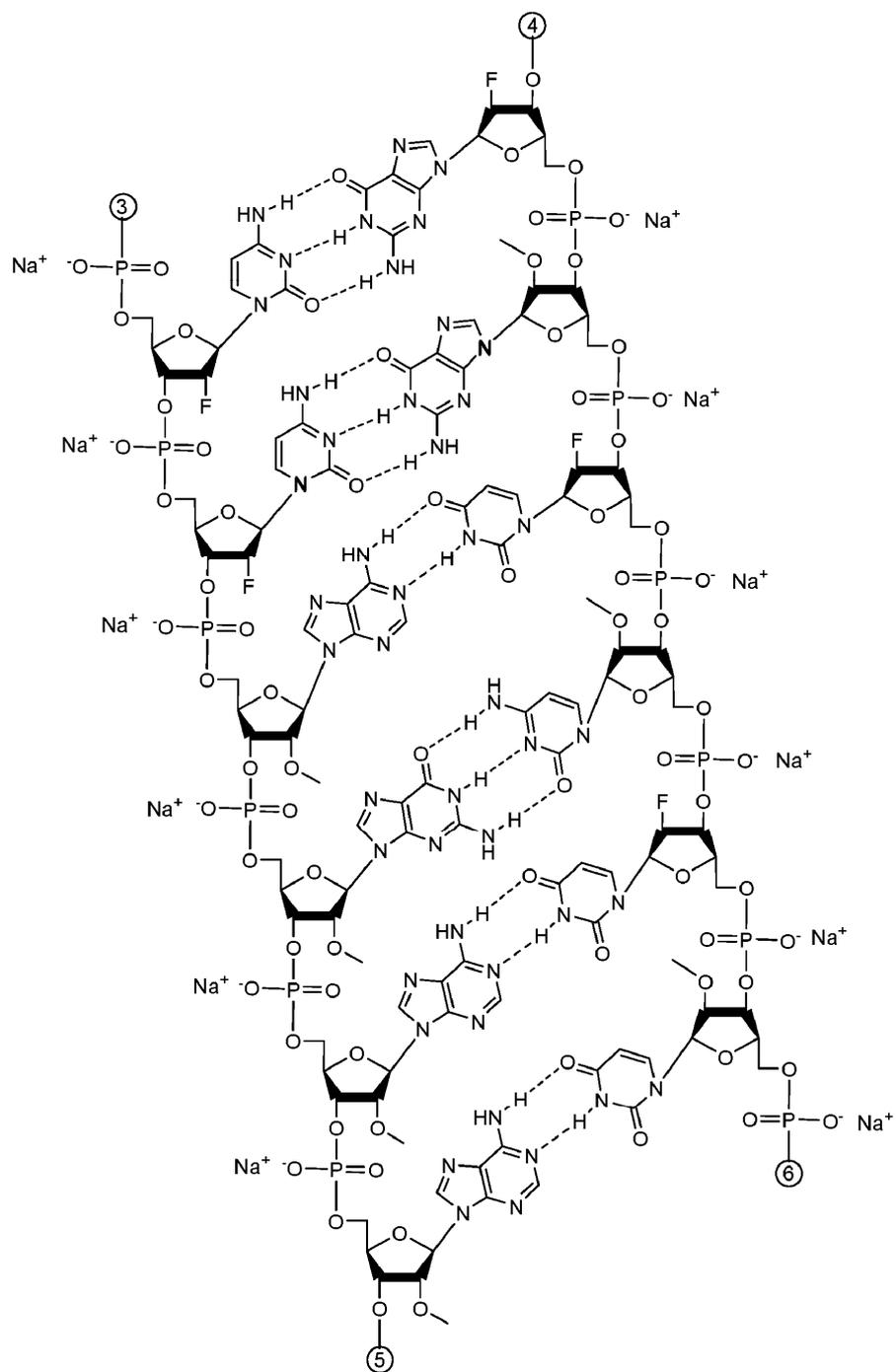
Фиг. 13D



Фиг. 14А

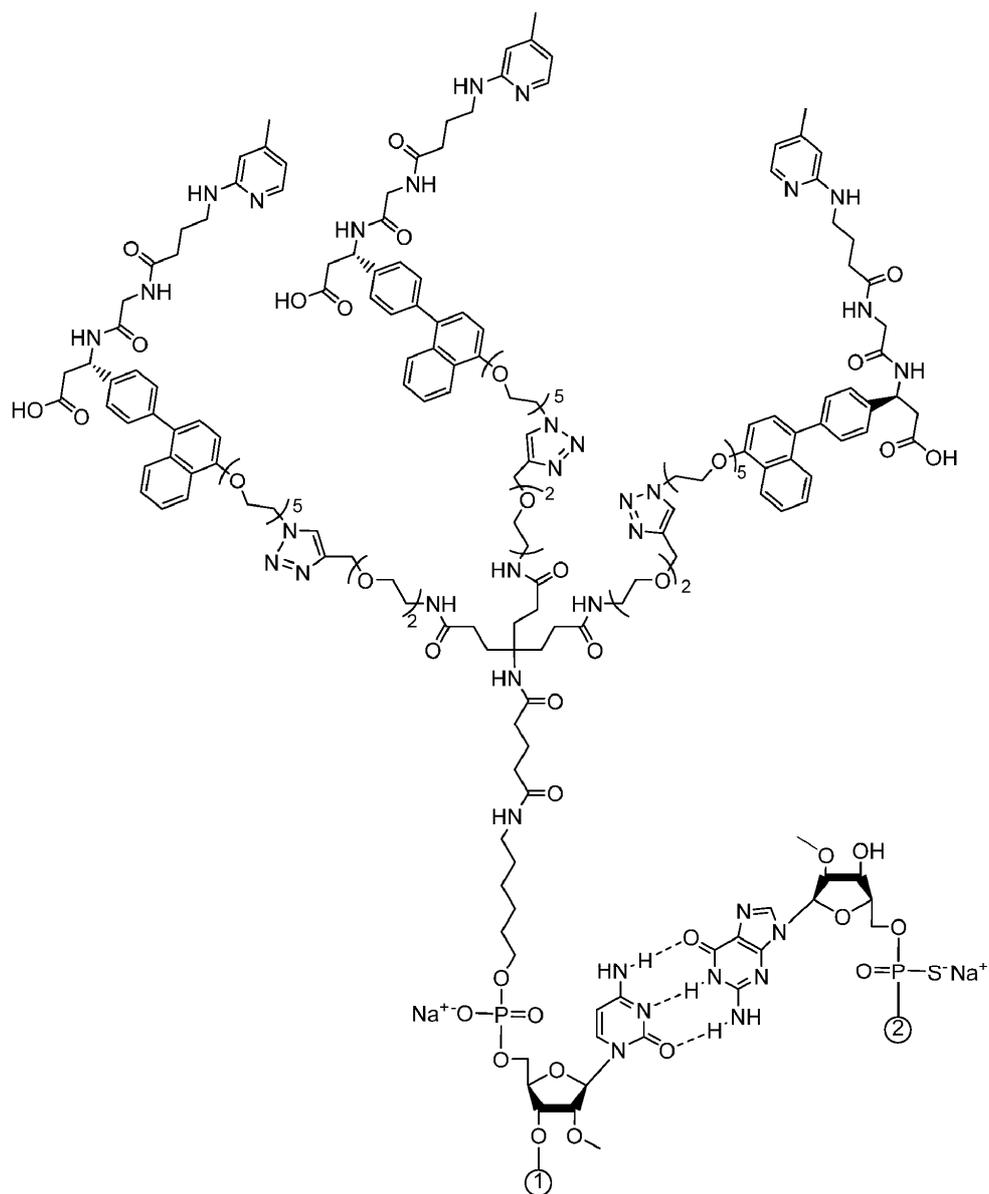


Фиг. 14В

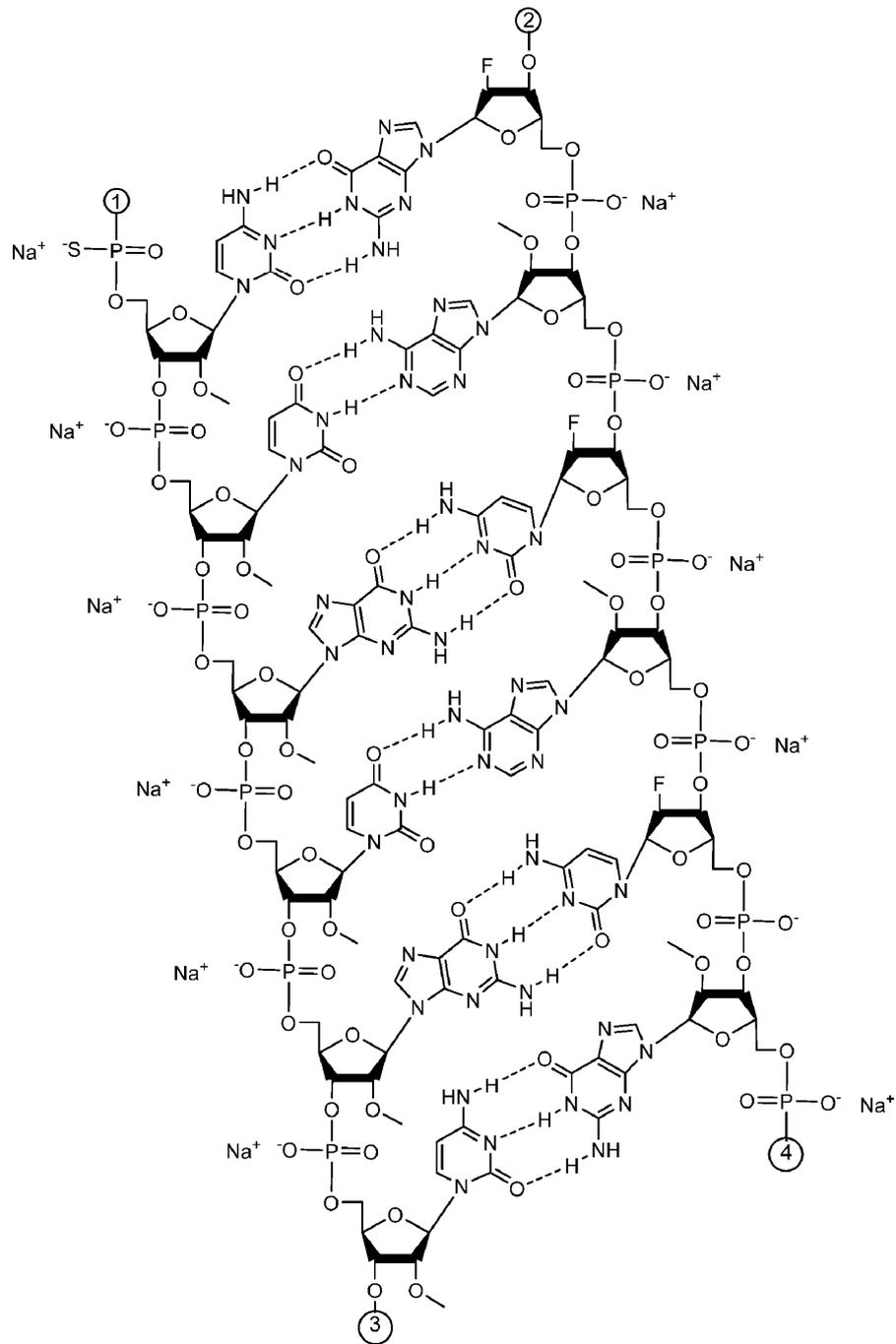


Фиг. 14С

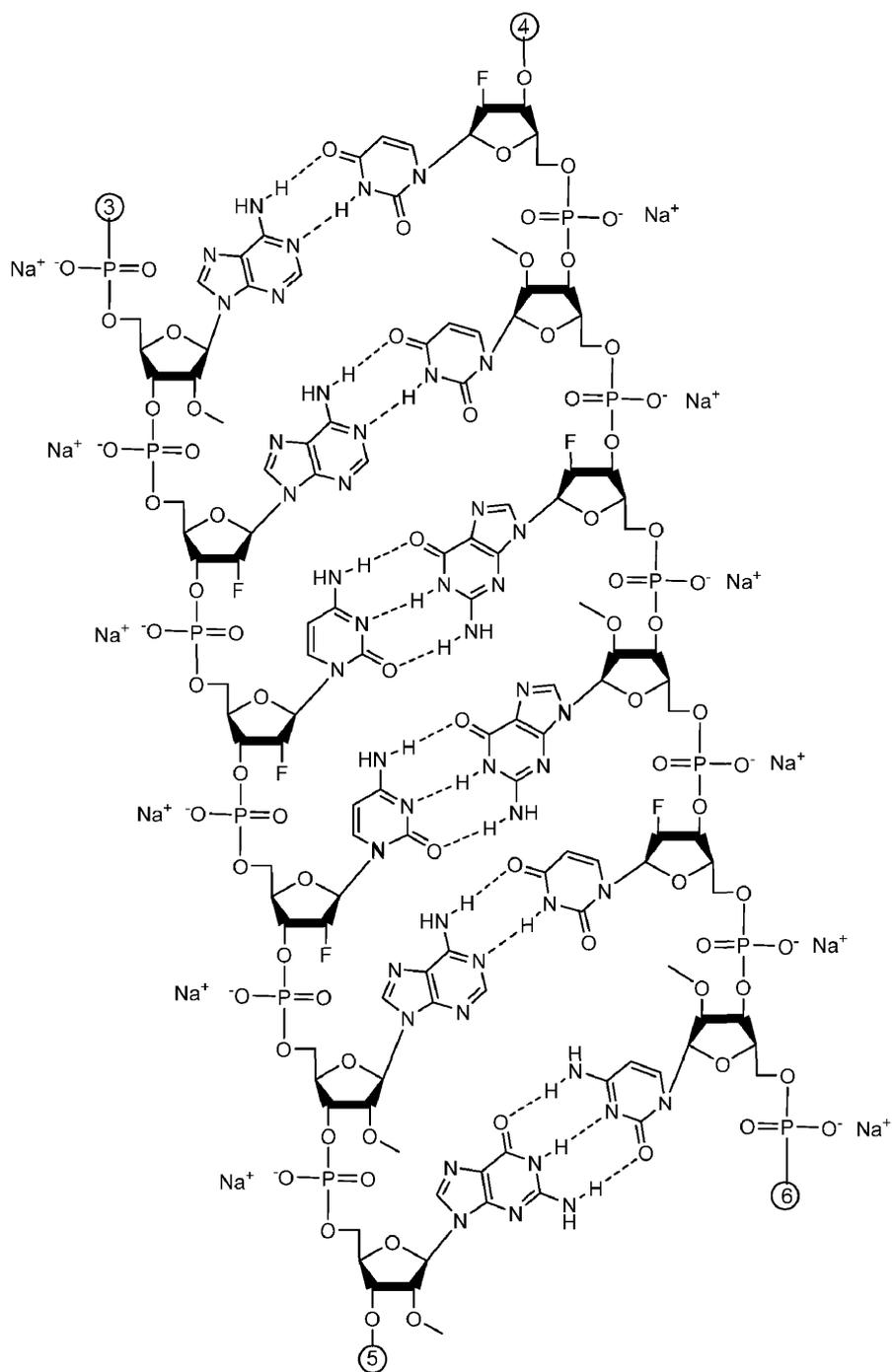




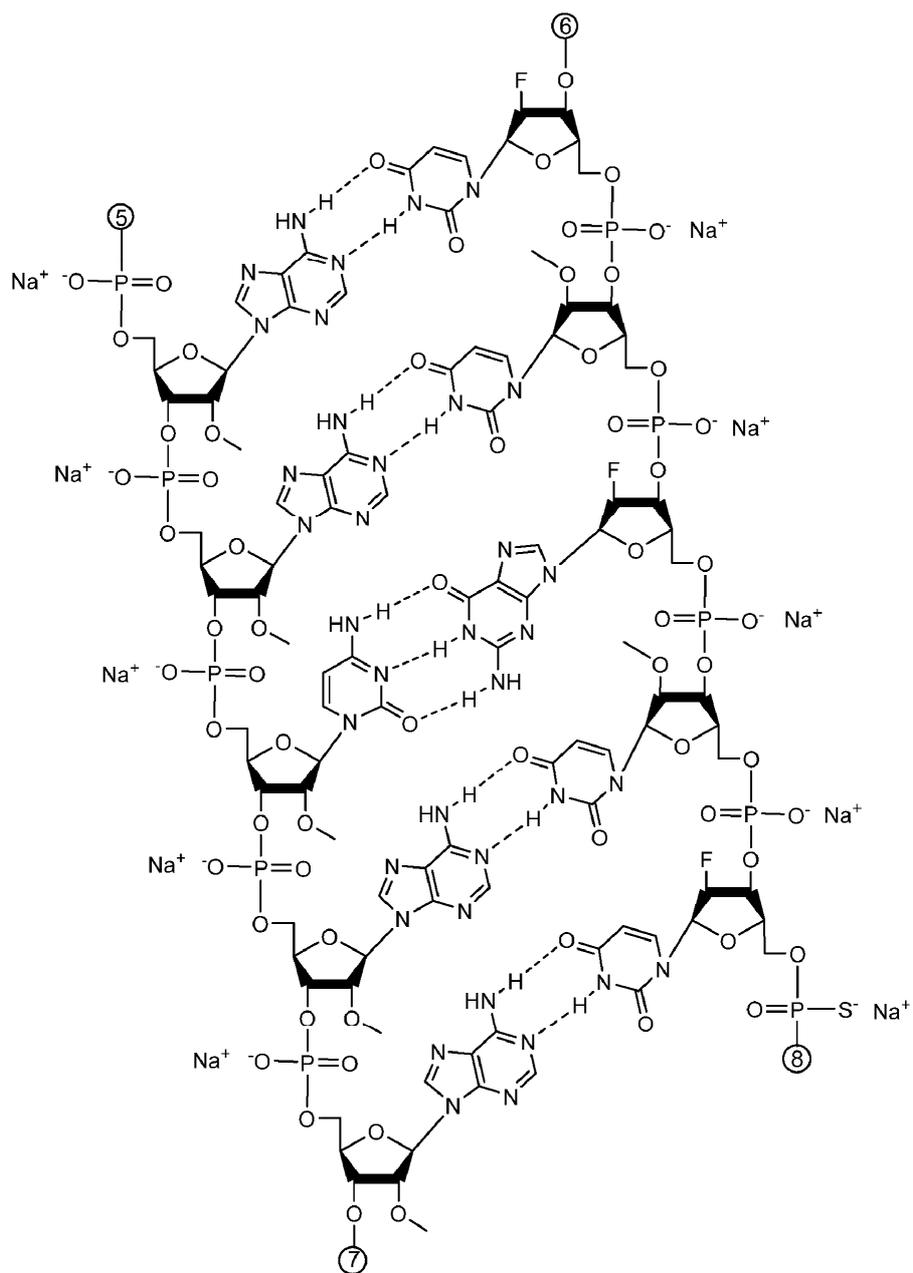
Фиг. 15А



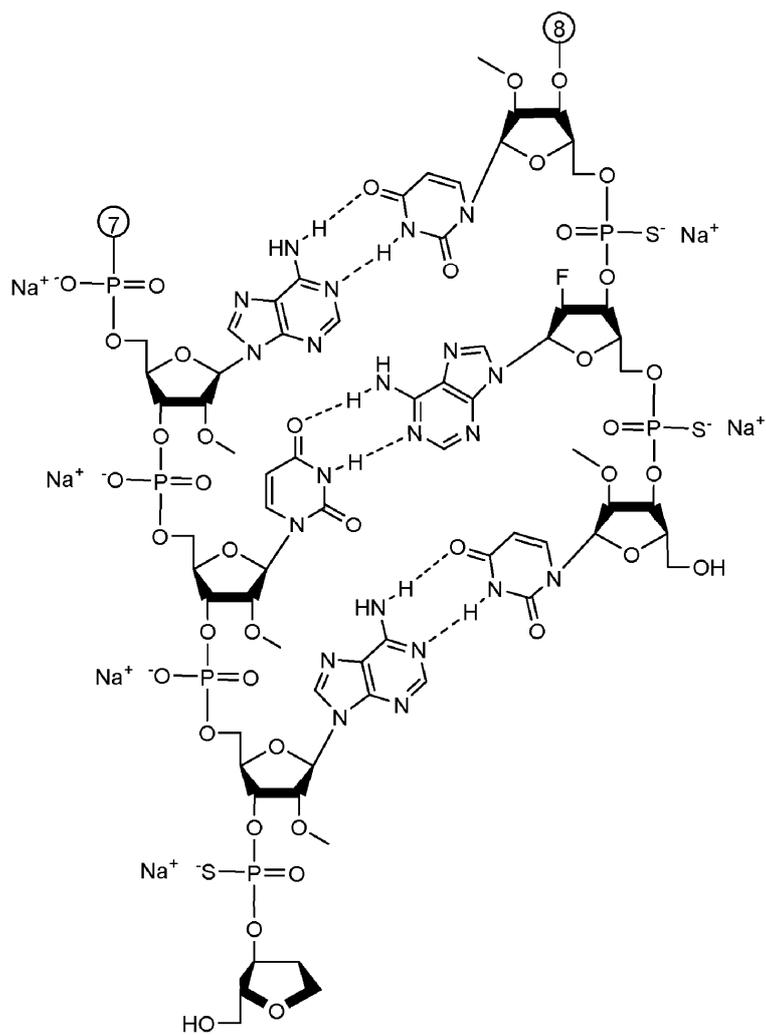
Фиг. 15В



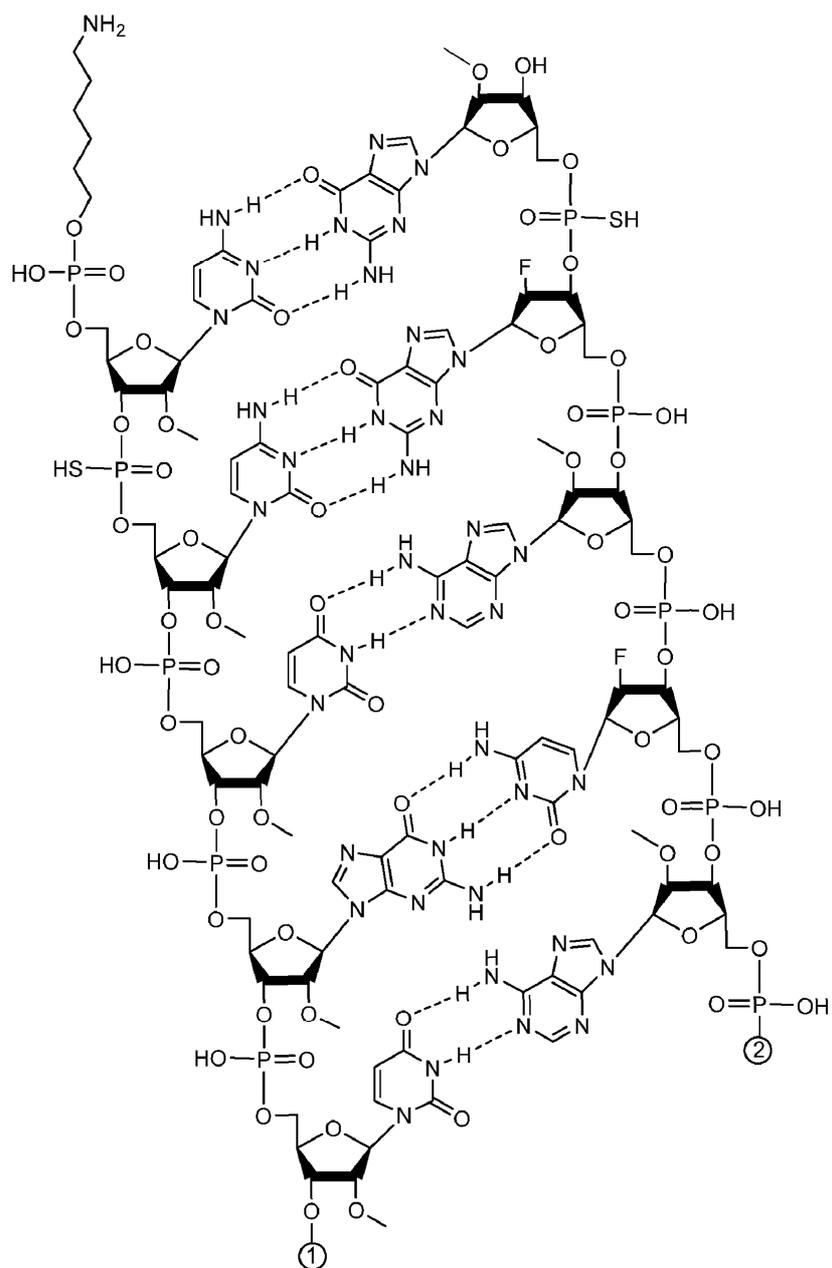
Фиг. 15С



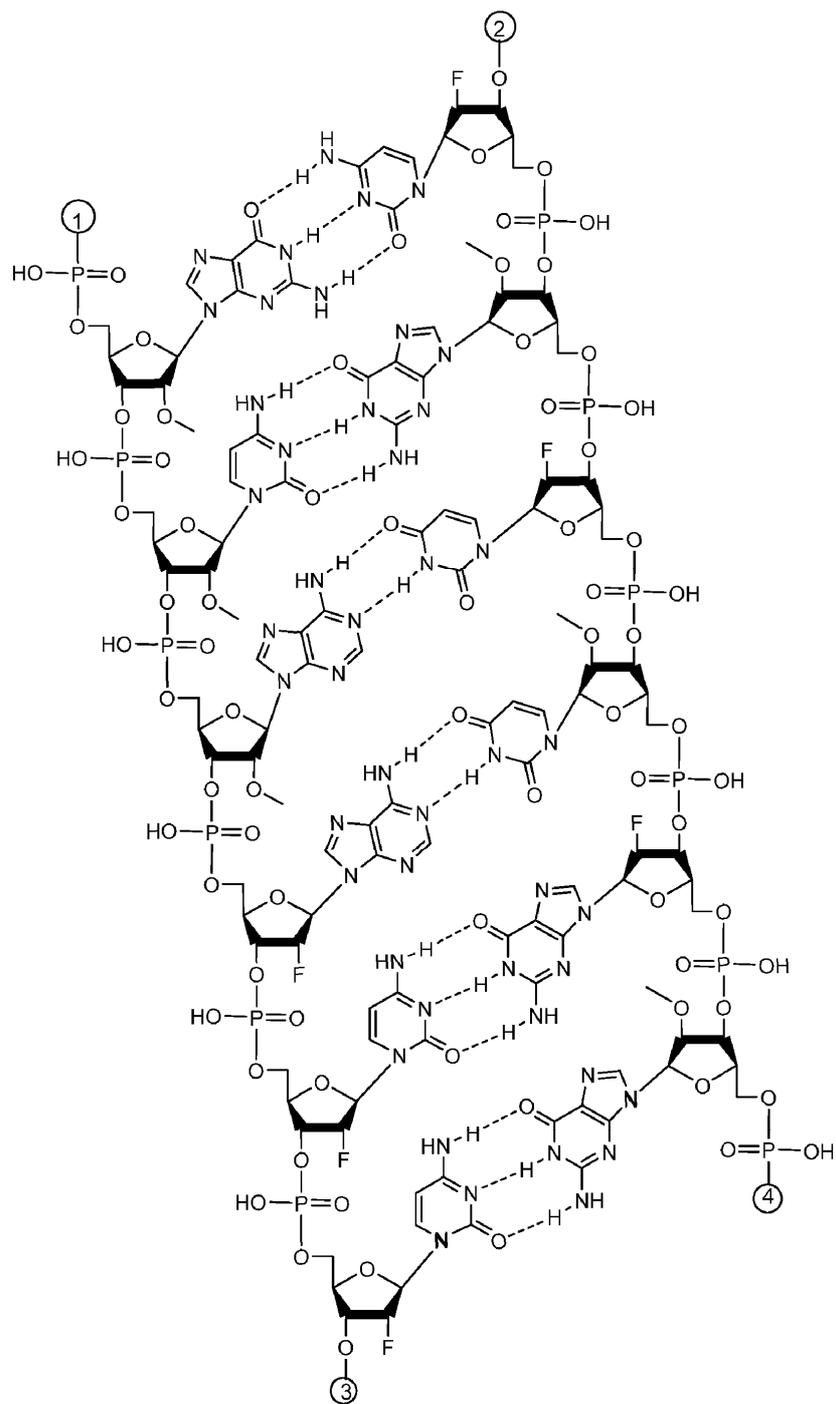
Фиг. 15D



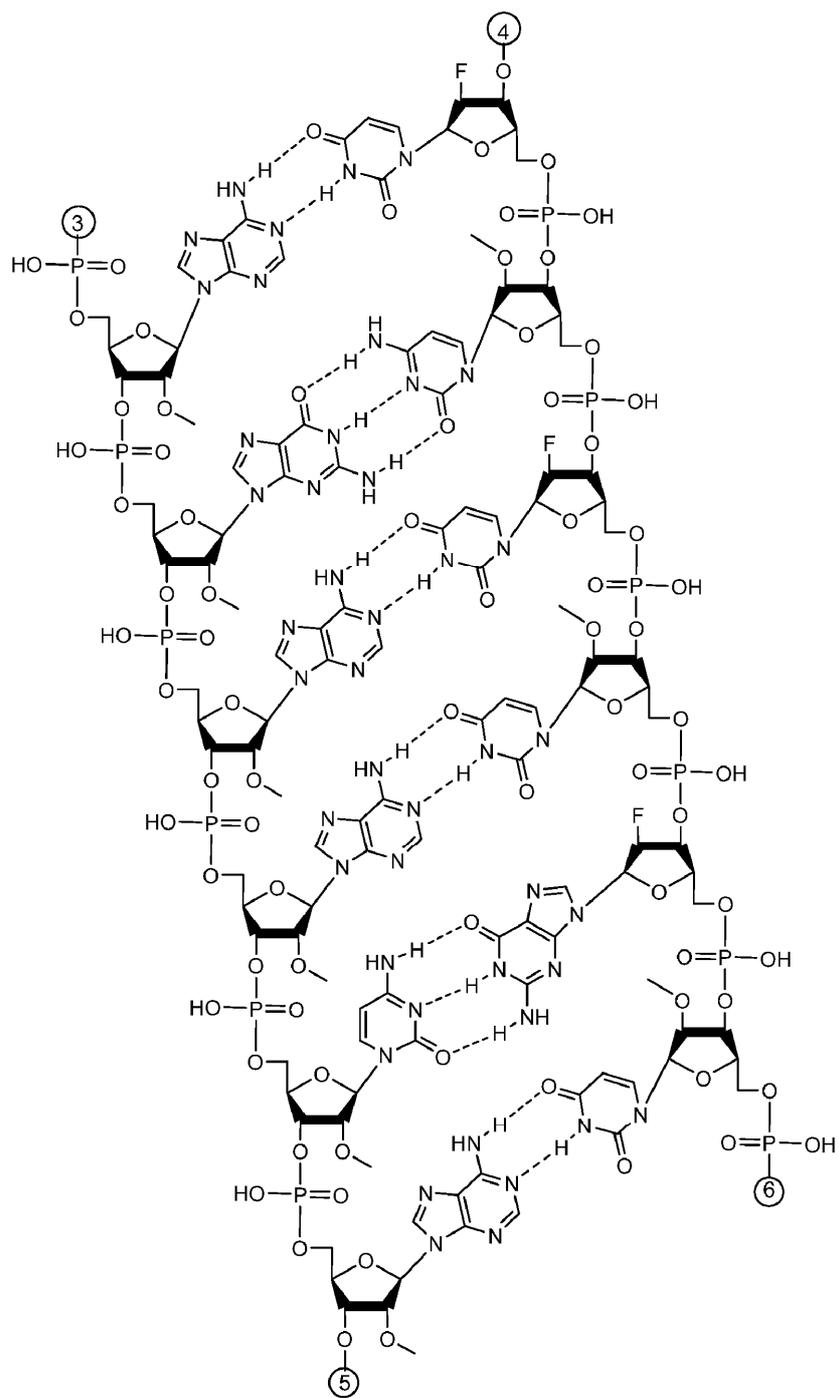
Фиг. 15Е



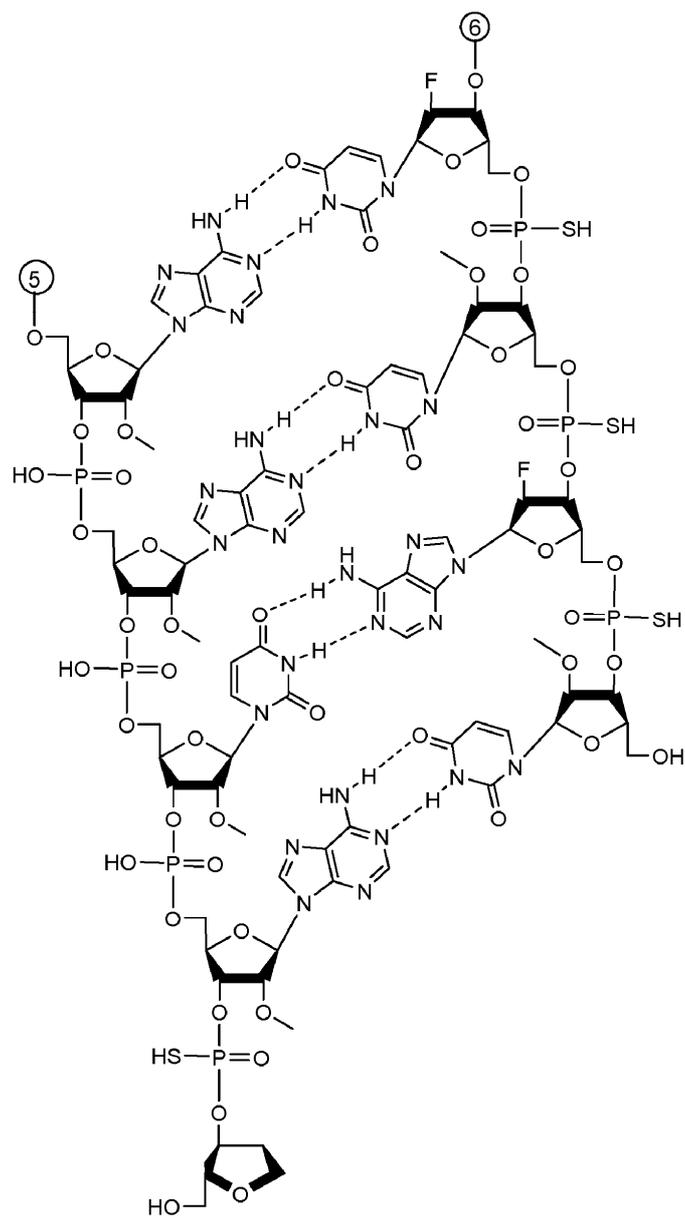
Фиг. 16А



Фиг. 16В



Фиг. 16С



Фиг. 16D

